



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/31, C07K 14/22, 14/705, 16/12, A61K 39/095	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/13860 (43) Date de publication internationale: 17 avril 1997 (17.04.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01580 (22) Date de dépôt international: 10 octobre 1996 (10.10.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/12106 10 octobre 1995 (10.10.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, Boîte postale 7046, F-69348 Lyon Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): QUENTIN-MILLET, Marie-José [FR/FR]; 70, cours Emile-Zola, F-69100 Villeurbanne (FR). ROKBI, Bachra [FR/FR]; 4, rue d'Aubigny, F-69003 Lyon (FR). (74) Mandataire: AYROLES, Marie-Pauline; Pasteur/Mérieux Sérums & Vaccins, 58, avenue Leclerc, Boîte postale 7046, F-69348 Lyon Cédex 07 (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, CN, HU, JP, MX, NO, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: NEISSERIA MENINGITIDIS SUBUNIT TBP2 (54) Titre: SOUS-UNITE TBP2 DE NEISSERIA MENINGITIDIS (57) Abstract <p>A substantially purified protein, i.e. the lower molecular weight subunit (Tbp2) of the human transferrin receptor (HTR) of an <i>N. meningitidis</i> strain characterised in that it is not recognised in a dot blot assay by an antiserum to a polypeptide that corresponds to the Tbp2 of <i>N. meningitidis</i> strain M982 (Tbp2 M982) deleted from the hypervariable portions of the second domain. The Tbp2 subunit is characterised (i) in that it is encoded by a DNA fragment of around 2.1 kb, and (ii) in that it has an M982-type hinge region. Said Tbp2 subunit and the polypeptide fragments derived therefrom are particularly useful as vaccines, especially when combined with known <i>N. meningitidis</i> Tbp2 subunits. DNA fragments coding for the novel Tbp2 and derived polypeptides are also disclosed.</p> (57) Abrégé <p>L'invention a pour objet une protéine sous forme substantiellement purifiée, qui est la sous-unité de moindre poids moléculaire (Tbp2) du récepteur de la transferrine humaine (RTH) d'une souche de <i>N. meningitidis</i>; la souche étant caractérisée en ce qu'elle n'est pas reconnue en dot blot par un antiserum obtenu à l'encontre d'un polypeptide correspondant à la Tbp2 de la souche <i>N. meningitidis</i> M982 (Tbp2 M982) déléetée des portions hypervariables du deuxième domaine; et la sous-unité Tbp2 étant caractérisée (i) en ce qu'elle est codée par un fragment d'ADN d'environ 2,1 kb et (ii) en ce qu'elle possède une région charnière de type M982. Cette sous-unité Tbp2 ainsi que les fragments polypeptidiques qui en sont dérivés sont notamment utiles à des fins vaccinales, plus particulièrement en association avec des sous-unités Tbp2 de <i>N. meningitidis</i> déjà connues. L'invention fournit également des fragments d'ADN codant pour ces nouvelles Tbp2 et polypeptides dérivés.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

SOUS-UNITE TBP2 DE NEISSERIA MENINGITIDIS

La présente invention a pour objet un nouveau variant de la sous-unité Tbp2 du récepteur transferrine de *Neisseria meningitidis*, son utilisation à titre de médicament, ainsi
5 que le fragment d'ADN codant pour ce variant.

D'une manière générale, les méningites sont soit d'origine virale, soit d'origine bactérienne. Les bactéries principalement responsables sont : *N. meningitidis* et *Haemophilus influenzae*, respectivement impliquées dans environ 40 et 50 % des cas de
10 méningites bactériennes.

On dénombre en France, environ 600 à 800 cas par an de méningites à *N. meningitidis*. Aux Etats-Unis, le nombre de cas s'élève à environ 2 500 à 3 000 par an.

15 L'espèce *N. meningitidis* est subdivisée en sérogroupes selon la nature des polysaccharides capsulaires. Bien qu'il existe une douzaine de sérogroupes, 90 % des cas de méningites sont attribuables à 3 sérogroupes : A, B et C.

Il existe des vaccins efficaces à base de polysaccharides capsulaires pour prévenir les
20 méningites à *N. meningitidis* sérogroupes A et C. Ces polysaccharides tels quels ne sont que peu ou pas immunogéniques chez les enfants de moins de 2 ans et n'induisent pas de mémoire immunitaire. Toutefois, ces inconvénients peuvent être surmontés en conjuguant ces polysaccharides à une protéine porteuse.

25 Par contre, le polysaccharide de *N. meningitidis* groupe B n'est pas ou peu immunogène chez l'homme, qu'il soit sous forme conjuguée ou non. Ainsi, il apparaît hautement souhaitable de rechercher un vaccin à l'encontre des méningites induites par *N. meningitidis* notamment du séro groupe B, autre qu'un vaccin à base de polysaccharide.

30 A cette fin, différentes protéines de la membrane externe de *N. meningitidis* ont déjà été proposées. Il s'agit en particulier du récepteur membranaire de la transferrine humaine.

D'une manière générale, la grande majorité des bactéries ont besoin de fer pour leur croissance et elles ont développé des systèmes spécifiques d'acquisition de ce métal. En ce
35 qui concerne notamment *N. meningitidis* qui est un pathogène strict de l'homme, le fer ne peut être prélevé qu'à partir de protéines humaines de transport du fer telles que la

transferrine et la lactoferrine puisque la quantité de fer sous forme libre est négligeable chez l'homme (de l'ordre de 10^{-18} M), en tout cas insuffisante pour permettre la croissance bactérienne.

5 Ainsi, *N. meningitidis* possède un récepteur de la transferrine humaine et un récepteur de la lactoferrine humaine qui lui permettent de fixer ces protéines chélatrices du fer et de capter par la suite le fer nécessaire à sa croissance.

10 Le récepteur de la transferrine de la souche *N. meningitidis* B16B6 a été purifié par Schryvers et al (WO 90/12591) à partir d'un extrait membranaire. Cette protéine telle que purifiée apparaît essentiellement constituée de 2 types de polypeptides : un polypeptide d'un poids moléculaire apparent élevé de 100 kDa et un polypeptide d'un poids moléculaire apparent moindre d'environ 70 kDa, telles que révélés après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

15 Le produit de la purification notamment mise en oeuvre par Schryvers est par définition arbitraire et pour les besoins de la présente demande de brevet, appelé récepteur de la transferrine humaine (RTH) et les polypeptides le constituant, des sous-unités. Dans la suite du texte, les sous-unités de poids moléculaire élevé et de poids moléculaire
20 moindre sont respectivement appelées Tbp1 et Tbp2.

25 Depuis les travaux pionniers de Schryvers et al. on a découvert qu'il existait en fait au moins 2 types de souches qui diffèrent par la constitution de leurs récepteurs de la transferrine respectifs. Ceci a été mis en évidence en étudiant des extraits de membrane externe de plusieurs dizaines de souches de *N. meningitidis* d'origines variées. Ces extraits membranaires ont tout d'abord été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, puis électrotransférés sur feuilles de nitrocellulose (Western Blot). Ces feuilles de nitrocellulose ont été incubées :

- 30 a) en présence d'un antisérum de lapin dirigé contre le récepteur de la transferrine purifié à partir de la souche *N. meningitidis* B16B6, aussi appelée IM2394 ;
- b) en présence d'un antisérum de lapin dirigé contre le récepteur de la transferrine purifié à partir de la souche *N. meningitidis* M982, aussi appelée IM2169 ; ou
- 35 c) en présence de la transferrine humaine conjuguée à la peroxydase.

En ce qui concerne a) et b), la reconnaissance des sous-unités du récepteur de la transferrine est révélée par addition d'un anticorps anti-immunoglobulines de lapin couplé à la peroxydase, puis par addition du substrat de cette enzyme.

5

Les tableaux I et II ci-dessous indiquent le profil de certaines souches représentatives tel qu'il apparaît sur gel de polyacrylamide à 7,5 % après électrophorèse en présence de SDS ; les bandes sont caractérisées par leur poids moléculaires apparents exprimés en kilodaltons (kDa) :

10

	Souches		
Tableau I	2394 (B; 2a; P1.2:L2.3) 2228 (B; nd) 2170 (B; 2a:P1.1:L3)	2234 (Y; nd) 2154 (C; nd) 2448 (B; nd)	550 (C; 2a:) 179 (C; 2a:P1.2)
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2394	93 68	93 69	99 69
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2169	93	93	99
Détection avec la transferrine peroxydase	68	69	69

N.B. : Entre parenthèses sont indiqués dans l'ordre le séro groupe, le sérotype, le sous-type et l'immunotype.

15

Souches									
Tableau II	2169 (B:9:P1.9)	1000 (B:nd)	1604 (B:nd)	132 (C:15:P1.16)	1001 (A:4:P1.9)	876 (B:19:P1.6)	1951 (A:nd)	2449 (B:nd)	867 (B:2b:P1.2)
Détection avec l'antisérum anti- récepteur 2394	96	98	98	98	98	96	94	94	93
Détection avec l'antisérum anti- récepteur 2169	96	98	98	98	98	96	94	94	93
	87	85	83	81	79	88	87	85	85
Détection avec la transferrine peroxydase	87	85	83	81	79	88	87	85	85

N.B. : Entre parenthèses sont indiqués dans l'ordre le sérotype, le sous-type et l'immunotype.

Les résultats répertoriés dans les 2 premières lignes des tableaux montrent qu'il existe 2 types de souches :

Le premier type (Tableau I) correspond à des souches qui possèdent un récepteur dont les 2 sous-unités dans les conditions expérimentales utilisées, sont reconnues en Western blot par l'antisérum anti-récepteur IM2394, tandis que seule la sous-unité de haut poids moléculaire est reconnue par l'antisérum anti-récepteur IM2169.

Le second type (Tableau II) correspond à des souches qui possèdent un récepteur dont les 2 sous-unités dans les conditions expérimentales utilisées, sont reconnues en Western blot par l'antisérum anti-récepteur IM2169, tandis que seule la sous-unité de haut poids moléculaire est reconnue par l'antisérum anti-récepteur IM2394.

En conséquence, il existe une diversité antigénique au niveau de la sous-unité de moindre poids moléculaire. Cette diversité est toutefois restreinte puisqu'elle se résout en 2 grands types, contrairement à ce qui est suggéré par Griffiths et al. FEMS Microbiol. Lett. (1990) 69 : 31.

Sur la base de ces observations, la demande WO 93/6861 distingue des souches de type M982 (IM2169) ou de type B16B6 (IM2394).

Outre les souches cités dans le tableau II, des souches de type M982 sont par exemples les souches S3032 (12. P 1.12.16), 6940 (19. P 1.6), M978 (8. P 1.1, 7), 2223 (B : nd), 1610 (B : nd), C708 (A : 4, P 1.7), M981 (B : 4), aussi appelée 891, et 2996 (B : 2b, P 1.2). Le déposant a reçu, par envoi gracieux, les souches S3032, M978 et M981 du Dr. J. Poolman (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas), et la souche C708 du Dr. Achtman (Max Planck Institute, Berlin, Allemagne).

La souche IM2154 (séro groupe C) est citée à titre d'exemple comme étant de type B16B6.

En vertu des précédentes constatations, on pouvait supposer qu'un vaccin efficace à l'encontre de toutes les infections à *N. meningitidis* pourrait être constitué de manière suffisante, de la sous-unité de haut poids moléculaire, quelle que soit la souche d'origine du récepteur, puisque cette dernière est reconnue par les 2 types d'antisérums. Toutefois, il semble que cela ne puisse être le cas dans la mesure où la sous-unité de haut poids

moléculaire ne serait pas capable d'induire la production d'anticorps de type neutralisant. Seule la plus petite des 2 sous-unités du récepteur (Tbp2) serait capable de remplir cette fonction.

5 En fait, la protéine Tbp2 plutôt que Tbp1, possède un certain nombre de caractéristiques qui en font un candidat vaccinal potentiel : une expression ubiquitaire, une accessibilité à la surface du germe, la capacité d'induire des anticorps neutralisants et une variabilité limitée puisque comme cela vient d'être exposé, deux groupes majeurs ont été identifiés à ce jour.

10

En vertu de cette découverte, on a déjà proposé des compositions pharmaceutiques contenant :

- 15 (i) le RTH d'au moins une souche de type B16B6 et le RTH d'au moins une souche de type M982 (WO 93/6861) ; ou
- (ii) la Tbp2 d'au moins une souche de type B16B6 et la Tbp2 d'au moins une souche de type M982 (WO 93/7172).

20 Pour accéder à de grandes quantités de protéines en vue d'un développement à l'échelle industrielle, on a cloné les fragments d'ADN codant *i.a.* pour diverses Tbp2s. Les séquences en acides aminés des sous-unités Tbp2 des souches M982 et B16B6 ont été divulguées dans la demande de brevet EPA 586 266 (publiée le 9 Mars 1994) ainsi que les fragments d'ADN correspondants. Ces séquences sont reprises dans les SEQ ID NO 1 à 4

25 de la présente demande.

 L'étude des sous-unités Tbp2 quelque soit la souche d'origine, a permis de mettre en évidence, trois domaines de structure principaux associés pour au moins l'un d'entre eux à des propriétés particulières. Par définition, les domaines de Tbp2 M982 et Tbp2 B16B6 ont

30 été fixés comme le montre le tableau ci-après, en indiquant la position des acides aminés, bornes incluses des différents domaines, et par référence à la numérotation apparaissant dans les SEQ ID NO 1 et 3.

35

	Tbp2 M982	Tbp2 B16B6
Domaine N-terminal ou premier domaine	1-345	1-325
Domaine charnière ou deuxième domaine	346-543	326-442
Domaine C-terminal ou troisième domaine	544-691	443-579

Cette définition s'applique de même à toutes les Tbp2s de type M982 ou B16B6, après alignement d'une séquence type M982 ou B16B6 sur la séquence de référence, au maximum d'homologie. Ainsi, à titre d'exemple et par référence à la Figure 1, on indique la position des domaines de la sous-unité Tbp2 de la souche 8680 comme suit : premier
5 domaine (1 - 334), deuxième domaine (335 - 530) et troisième domaine (531 - 677).

Il est maintenant connu que le domaine N-terminal ou premier domaine comporte dans son intégralité le site de liaison à la transferrine et se trouve donc très
10 vraisemblablement exposé vers l'extérieur. En conséquence le seul domaine N-terminal constitue un élément de choix à des fins *i.a.* vaccinales.

D'autre part, l'étude comparative des séquences Tbp2s M982 et B16B6 alignées au maximum d'homologie, a mis en évidence quatre portions hypervariables localisées au sein
15 de la région charnière (aussi appelée domaine charnière, comme cela apparaît dans le tableau ci-dessus) de Tbp2 M982 ; portions qui sont absentes dans la Tbp2 B16B6. Ces portions hypervariables se retrouvent chez toutes les Tbp2s de type M982 (Figure 2). Les souches de type B16B6 en sont dépourvues. Par la suite, on entend par "région charnière de type M982" une région charnière qui possède ces quatre portions hypervariables.

20 L'étude des séquences a permis de faire évoluer les définitions des types M982 et B16B6, originellement fournies dans WO 93/6861. On convient maintenant de définir les types de souches sur la base de la présence ou l'absence des régions hypervariables et par conséquent sur la taille du gène *tbp2* : environ 2.1kb pour *tbp2* de type M982 et 1.8 kb
25 pour *tbp2* de type B16B6.

Par comparaison des séquences de diverses Tbp2s de type M982, on sait aussi que la région charnière présente une variabilité supérieure à celle des deux autres domaines. Dans

la mesure où la région charnière ne semblait pas indispensable à la fonction de fixation de la transferrine humaine, on a postulé que le rôle de cette région est au moins en partie d'induire une variabilité-"écran" afin d'éviter la reconnaissance d'une souche par le système immunitaire d'un individu ayant connu ultérieurement une autre souche.

5

Dans cette hypothèse, la région charnière des souches de type M982 constitue un problème majeur dans la réalisation d'un vaccin. En effet si cette région est immunodominante, lors d'une immunisation, les anticorps induits seront dirigés majoritairement contre cette région et par conséquent la réponse immunitaire sera spécifique de la protéine Tbp2 de la souche homologue.

10

En tenant compte des observations et hypothèses évoquées ci-dessus, il déjà été proposé d'utiliser *i.a.* à des fins vaccinales, non plus des Tbp2s de type M982 entières, mais des Tbp2s au moins délétées de leurs quatre portions hypervariables ou de façon alternative, délétées des deuxième et troisième domaines.

15

Une région essentielle pour l'induction d'une immunité à large spectre étant vraisemblablement le premier domaine, une composition pharmaceutique de choix est apparue comme pouvant être par exemple, au moins composée :

20

- (i) d'un polypeptide correspondant à une Tbp2 de type M982 délétée au moins partiellement du deuxième ou du troisième domaine *e.g.* d'un polypeptide correspondant au premier domaine d'une Tbp2 de type M982 ; et
- (ii) d'une Tbp2 de type B16B6 ou d'un polypeptide correspondant à une Tbp2 de type B16B6, délétée au moins partiellement du deuxième ou du troisième domaine *e.g.* d'un polypeptide correspondant au premier domaine d'une Tbp2 de type B16B6 (demande PCT n° de dépôt PCT/FR95/000701 ; référence est faite aux définitions initiales des types de souches).

25

30

Par la suite, l'étude de l'immunodominance de la région charnière des Tbp2s de type M982 a été poursuivie et complétée en analysant vis-à-vis d'un grand nombre de souches de type M982, la réactivité croisée des sérums obtenus à l'encontre :

35

- (i) de la protéine Tbp2 M982 entière (Tbp2 100%) ;

- (ii) de la protéine Tbp2 M982 tronquée ne comportant que les 350 premiers acides aminés N-terminaux (Tbp2 50%) ; et
- (iii) de la protéine Tbp2 M982 délétée des quatre portions hypervariables (Δ 362-379 ; Δ 418-444 ; Δ 465-481 ; et Δ 500-520) de la région charnière (Tbp2 80%).

Pour ce faire, les protéines Tbp2s entières, tronquées et délétées ont été tout d'abord produites dans *E. coli* par voie recombinante. Pour ce qui concerne Tbp2 M982 entière, sa production est décrite dans EPA 586 266 (publiée le 9 mars 1994). Celles des deux autres Tbp2s M982 sont reportées dans les Exemples 4 et 6 de la présente demande.

La préparation des sérums hyperimmuns ainsi que l'analyse de ces sérums, préliminaire à l'étude d'immunodominance, fait l'objet de l'Exemple 8 de la présente demande. L'étude de la réactivité croisée fait l'objet de plus de détails dans l'Exemple 9.

Cinquante quatre souches classées dans le type M982 soit par analyse des protéines de membrane externe en électrophorèse de SDS-Page suivie d'une immunorévélation, soit sur la base de la taille du gène *tpb2* amplifié par PCR, ont été étudiées en dot blot (analyse sur germes entiers) pour leur réactivité croisée (voir l'Exemple 9). Ces souches ont été obtenues à titre gracieux auprès du Dr D.A. Caugant. Elles ont été isolées dans des régions du monde très diverses et à différentes périodes. Par conséquent, cette collection devrait être représentative. 14 souches ne sont pas reconnues par le sérum anti-Tbp2 M982 100%, tandis que seulement 4 échappent à la reconnaissance par le sérum anti-Tbp2 M982 80% et 1 par le sérum anti-Tbp2 M982 50%.

Ces résultats confirment l'hypothèse initiale selon laquelle une protéine Tbp2 délétée des portions hypervariables induit une réactivité croisée plus importante que celle observée avec une protéine entière. La réactivité croisée est encore améliorée dans le cas d'une protéine Tbp2 n'ayant conservé que le domaine de liaison à la transferrine, puisque seulement une souche parmi 54, n'est pas reconnue. L'immunogénicité d'une Tbp2 est influencée par la présence de la région charnière qui induit des anticorps spécifiques de la souche homologue. En supprimant au moins les quatre portions hypervariables, la réponse immune contre des épitopes situés en dehors de la région charnière, semble favorisée.

Seulement 4 souches parmi les 54 souches de type M982 n'ont pas réagi avec le sérum anti-Tbp2 80%. Ce résultat peut s'expliquer notamment par le fait qu'au moins une de ces souches diffère très largement de la souche de référence M982. Par conséquent il apparaît nécessaire d'ajouter aux compositions pharmaceutiques déjà connues, au moins
5 une troisième valence.

C'est pourquoi l'invention a pour objet une protéine sous forme substantiellement purifiée, qui est la sous-unité de moindre poids moléculaire (Tbp2) du récepteur de la transferrine humaine (RTH) d'une souche de *N. meningitidis* ; la souche étant caractérisée
10 en ce qu'elle n'est pas reconnue en dot blot par un antisérum obtenu à l'encontre d'un polypeptide correspondant à la Tbp2 de la souche *N. meningitidis* M982 (Tbp2 M982) déletée des portions hypervariables de sa région charnière (Tbp2 M982 Δ 362 - 379 ; Δ 418 - 444 ; Δ 465 - 481 ; Δ 500 - 520) ; et la sous-unité Tbp2 étant caractérisée (i) en ce qu'elle est codée par un fragment d'ADN d'environ 2,1 kb.
15

En d'autres termes, puisque la sous-unité Tbp2 selon l'invention est caractérisée (i) en ce qu'elle est codée par un fragment d'ADN d'environ 2,1 kb, la souche de *N. meningitidis* dont elle dérive, est elle-même caractérisée en ce que son génome comprend un cadre de lecture ouvert (ORF) codant pour ladite sous-unité Tbp2 d'environ 2,1 kb.
20

Puisque la protéine selon l'invention est codée par un fragment d'ADN d'environ 2,1 kb, il est bien évident, compte tenu de ce qui a été dit précédemment, que cette protéine possède une région charnière de type M982.

La réactivité entre un sérum anti-Tbp2 80% et un sérum anti-Tbp2 50% peut aussi s'expliquer par le fait que dans la construction qui a servi à la production du sérum anti-Tbp2 80% certaines séquences variables demeurent alors que dans les protéines 50%, toutes ces séquences sont supprimées. En effet, seule une souche parmi les 54 souches de type M982 n'a pas réagi avec le sérum anti-Tbp2 50%. Il s'agit de la souche 8680
30 B:15:P1.3, isolée au Chili lors de l'épidémie de 1987, et appartenant au groupe électrophorétique ET-5. Cette souche provient de la collection du Dr D.A. Caugant, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Meningococci, National Institute of Public Health, Oslo, Norway. La protéine Tbp2 issue de cette souche constitue donc tout particulièrement un candidat vaccinal de choix.
35

C'est pourquoi une sous-unité Tbp2 selon l'invention dérive de manière avantageuse d'une souche de *N. meningitidis* qui n'est pas reconnue en dot blot par un antisérum obtenu à l'encontre d'un fragment de Tbp2 M982 allant de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 350 c'est-à-dire à l'encontre d'un polypeptide correspondant à la Tbp2 de la souche *N. meningitidis* M982 substantiellement déletée des deuxième et troisième domaines.

Une sous-unité Tbp2 selon l'invention dérive notamment d'une souche de *N. meningitidis* dont la sous-unité Tbp2 est reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum obtenu à l'encontre du RTH de la souche M982 (antisérum anti-RTH M982) et par un antisérum obtenu à l'encontre du RTH de la souche B1616 (antisérum anti-RTH B16B6). De tels antisérums ont été décrits dans la demande de brevet WO 93/6861.

Par "sous-unité Tbp2 qui dérive d'une souche de *N. meningitidis*" on entend bien évidemment une dérive prise dans son sens le plus général ; c'est-à-dire non limitée à un procédé physique, mais le fruit d'un processus intellectuel. Ainsi cette expression recouvre *i.a.* une Tbp2 produite par voie recombinante *e.g.* dans *E. coli*.

Une sous-unité Tbp2 selon l'invention comprend une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie (d'identité) avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 M982, telle que montrée dans l'ID SEQ No. 1, est de 60 à 70%, avantageusement d'environ 65%. Sous un autre aspect, une sous-unité Tbp2 selon l'invention comprend une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 8680, telle que montrée dans l'ID SEQ No. de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 677, est de 80 à 100%, avantageusement de 90 à 100%, de manière préférée de 95 à 100%. Selon un mode particulier, elle comprend une séquence d'acides aminés substantiellement telle que montrée dans l'ID SEQ No. 5 commençant avec le résidu acide aminé en position 1 et finissant avec le résidu acide aminé en position 677.

Une sous-unité Tbp2 selon l'invention peut être sous forme dissociée de la sous-unité de haut poids moléculaire (Tbp1) de la souche de *N. meningitidis* dont est issue la Tbp2 ou bien en association avec cette Tbp1, formant ainsi un complexe Tbp1-Tbp2 considéré comme le récepteur de la transferrine humaine. Qu'elle soit sous forme dissociée ou sous forme de complexe Tbp1-Tbp2, la sous-unité Tbp2 selon l'invention doit être substantiellement purifiée ; c'est-à-dire séparée de l'environnement dans lequel elle existe

de manière naturelle. Entre autres, il peut s'agir d'une préparation notamment dépourvue des protéines cytoplasmiques et périsplasmiques d'*H. pylori*.

L'invention concerne également un fragment d'ADN isolé codant pour une protéine
5 selon l'invention ainsi que pour un précurseur de cette protéine ; ce dernier comprenant un peptide signal homologue ou hétérologue à la protéine selon l'invention. Un fragment d'ADN codant pour une protéine selon l'invention est décrit dans le ID SEQ NO 5 de l'acide nucléique en position 30 à l'acide nucléique en position 2061. Un fragment d'ADN codant pour un précurseur d'une protéine selon l'invention est décrit dans le ID SEQ NO 5
10 de l'acide nucléique en position 1 à l'acide nucléique en position 2061.

Un fragment d'ADN selon l'invention peut aussi comprendre une séquence d'acides nucléiques autre que celle montrée dans l'ID SEQ NO 5 à condition qu'il puisse s'hybrider au fragment d'ADN montré dans l'ID SEQ NO 5, dans des conditions de forte stringence.

15 Des méthodes d'hybridation ainsi que la mise en oeuvre de conditions de forte stringence sont à la portée de l'homme de l'art. Par exemple, des procédures d'hybridation sont décrites dans Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994 ; Silhavy et al. Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Lab.,
20 1984 ; Davis et al, A Manual for Genetic Engineering : Advanced Bacterial Genetics, CSH Lab., 1980. Pour ligne de conduite générale, on indique des paramètres importants dont on doit tenir compte afin d'optimiser les conditions d'hybridation. se retrouvent dans la formule qui permet de calculer une valeur critique, la température de fusion (T_m), au dessus de laquelle deux brins complémentaires se séparent (Casey & Davidson, Nucl. Acid
25 Res. (1977) 4 : 1539). Cette formule est comme suit : $T_m = 81.5 + 0.5 \times (\% \text{ G+C}) + 1.6 \log (\text{positive ion concentration}) - 0.6 \times (\% \text{ formamide})$. Dans des conditions de forte stringence, la température d'hybridation est environ 20-25°C en dessous de la température de fusion telle que calculée. Par exemple, des conditions de forte stringence sont obtenus en réalisant des incubations de pré-hybridation et d'hybridation pendant 4 - 16 hrs, à
30 environ 55 - 60°C, en solution 6 x SSC (NaCl 1 M, sodium citrate 0.1 M, pH 7.0).

L'invention concerne également (i) un polypeptide dérivé notamment par délétion d'une sous-unité Tbp2 selon l'invention ; et (ii) un fragment d'ADN isolé codant pour un tel polypeptide.

35

Il s'agit plus particulièrement d'un polypeptide ayant une séquence en acides aminés qui dérive de celle d'une sous-unité Tbp2 selon l'invention dont le premier, deuxième et troisième domaines sont définis par alignement au maximum d'homologie, sur la séquence de la sous-unité Tbp2 de la souche de référence M982 ; notamment par délétion totale ou partielle d'au moins un domaine de ladite sous-unité Tbp2 selon l'invention, à condition que le premier et deuxième domaines ne soient pas simultanément et totalement délétés.

Par "séquence qui dérive d'une autre séquence" on entend bien évidemment une séquence issue par processus intellectuel de cette autre séquence.

Sous un autre aspect, il s'agit d'un polypeptide capable de se lier à la transferrine humaine et dérivé d'une sous-unité Tbp2 selon l'invention, notamment par délétion d'un ou plusieurs acides aminés localisés du côté de l'extrémité C-terminale ou dans la région des quarante premiers acides aminés de la sous-unité Tbp2. L'extrémité C-terminale est définie comme étant la partie de Tbp2 correspondant aux deuxième et troisième domaines.

De manière plus particulière, un polypeptide selon l'invention possède une séquence d'acides aminés qui dérive d'une sous-unité Tbp2 selon l'invention :

(i) notamment par délétion totale ou partielle d'au moins un domaine de ladite sous-unité Tbp2, sélectionné parmi les deuxième et troisième domaines ; de préférence par délétion totale ou partielle du troisième domaine ou des deuxième et troisième domaines ;

(ii) notamment par délétion totale des premier et troisième domaines, ou

(iii) notamment par délétion intégrale du troisième domaine et par délétion partielle du premier domaine, optionnellement par délétion partielle du deuxième domaine.

D'une manière avantageuse, un polypeptide selon l'invention présente une délétion partielle, quasi totale ou totale du troisième domaine, de préférence totale. Dans ce cas là, le premier ainsi que le deuxième domaine peuvent être maintenus dans leur intégralité, partiellement ou totalement délétés; ceci indépendamment l'un de l'autre.

Sont possibles les combinaisons suivantes (sachant que les premier, deuxième et troisième domaines dans leur intégralité sont respectivement représentés par 1, 2 et 3, et que O et Δ signifient de manière respective, partiellement et totalement délété) :

- 5 1, 2, Δ3 ; 1, O2, Δ3 ; 1, Δ2, Δ3 ;
 O1, 2, Δ3 ; O1, O2, Δ3 ; O1, Δ2, Δ3 ;
 Δ1, 2, Δ3 ; Δ1, O2, Δ3 ;
- 1, 2, O3 ; 1, O2, O3 ; 1, Δ2, O3 ;
- 10 O1, 2, O3 ; O1, O2, O3 ; O1, Δ2, O3 ;
 Δ1, 2, O3 ; Δ1, O2, O3 ;

Est aussi d'intérêt tout particulier, un polypeptide dérivé d'une sous-unité Tbp2 selon l'invention par délétion partielle du deuxième domaine, qui comporte dans leur
 15 intégralité ou quasi intégralité le premier et troisième domaines ; soit la combinaison 1, O 2. 3. (Par "domaine maintenu dans sa quasi-intégralité" on entend ici et dans la suite du texte, un domaine modifié en un très faible nombre de positions, environ 5 maximum.) Un polypeptide selon l'invention peut aussi répondre à la combinaison O1, O2, 3, la délétion
 20 partielle du premier domaine portant avantageusement sur tout ou partie de la région homologe de celle de Tbp2 M982, allant de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé approximativement en position 40.

De manière avantageuse, lorsqu'un polypeptide dérive notamment par délétion partielle du deuxième domaine d'une sous-unité Tbp2 selon l'invention, cette délétion
 25 partielle porte substantiellement sur une ou des régions du deuxième domaine qui sont les homologues des régions de la séquence M982 allant :

- (i) de l'acide aminé en position 388 à l'acide aminé en position 396 ;
- 30 (ii) de l'acide aminé en position 418 à l'acide aminé en position 476 ; et
- (iii) de l'acide aminé en position 499 à l'acide aminé en position 521.

De manière alternative, une délétion partielle du deuxième domaine porte
 35 substantiellement sur une ou des portions hypervariables. Ces portions sont, après

alignement au maximum d'homologie, les homologues des portions de la séquence M982 allant :

- 5 (i) de l'acide aminé en position 362 à l'acide aminé en position 379 ;
- (ii) de l'acide aminé en position 418 à l'acide aminé en position 444 ;
- (iii) de l'acide aminé en position 465 à l'acide aminé en position 481 ; et
- 10 (iv) de l'acide aminé en position 500 à l'acide aminé en position 520.

De préférence, la délétion partielle porte simultanément sur les quatre portions (i) à (iv) sus-décrites.

15 Lorsqu'un polypeptide selon l'invention dérive notamment par délétion intégrale du troisième domaine et délétion quasi intégrale du deuxième domaine d'une sous-unité Tbp2 selon l'invention et comporte l'intégralité du premier domaine ou dérive en outre par
20 délétion de la partie N-terminale du premier domaine, la délétion quasi intégrale du deuxième domaine s'étend sur la région qui est l'homologue de la région du deuxième domaine de la sous-unité Tbp2 M982 allant de l'acide aminé dans l'une des positions 346 à 361 à l'acide aminé en position 543.

Lorsqu'un polypeptide dérive notamment par délétion partielle du premier domaine d'une sous-unité Tbp2 selon l'invention, cette délétion partielle porte avantageusement sur
25 tout ou partie de la région qui est l'homologue de la région du premier domaine de la sous-unité Tbp2 de type M982 allant de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 281.

A titre d'exemple de ce qui précède, on cite une délétion d'intérêt portant sur tout ou
30 partie de la région qui est l'homologue de la région du premier domaine de ladite sous-unité Tbp2 de type M982 allant de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé approximativement en position 40.

Le degré d'homologie peut être aisément calculé en alignant les séquences de
35 manière à obtenir le degré maximal d'homologie ; pour ce faire, il peut être nécessaire d'introduire artificiellement des emplacements vacants, comme cela est illustré dans la

Figure 1. Une fois que l'alignement optimal est réalisé, le degré d'homologie est établi en comptabilisant toutes les positions dans lesquelles les acides aminés des deux séquences se retrouvent à l'identique, par rapport au nombre total de positions.

5 Il serait fastidieux de décrire des séquences homologues autrement que de manière générique, en raison du trop grand nombre de combinaisons. L'homme du métier connaît toutefois les règles générales qui permettent de remplacer un acide aminé par un autre sans abolir la fonction biologique ou immunologique d'une protéine.

10 A titre d'exemple préféré, on cite un polypeptide selon l'invention dont la séquence possède au moins 70-75%, de manière avantageuse au moins 80%, de préférence au moins 90%, de manière tout à fait préférée 100% d'homologie avec :

15 (i) la séquence telle que montrée dans l'ID SEQ NO 5, de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé dans l'une des positions 334 à 351, avantageusement en position en position 334 ;

20 (ii) la séquence telle que montrée dans l'ID SEQ NO 5, de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 677, déletée des régions 377-385, 407-465 et 488-508 ;

25 (iii) la séquence telle que montrée dans l'ID SEQ NO 5, de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 677, déletée des portions 351-368, 407-433, 454-470 et 489-508; ou avec

(iv) la séquence telle que montrée dans l'ID SEQ NO 5, de l'acide aminé en position 335 à l'acide aminé en position 530.

30 Un polypeptide selon l'invention possède une séquence d'acide aminés qui comprend au moins 10, avantageusement au moins 20, de préférence au moins 50, de manière tout à fait préférée au moins 100 acides aminés.

35 Bien évidemment, un polypeptide selon l'invention peut aussi comprendre de manière additionnelle, une séquence d'acides aminés qui ne présente pas d'homologie avec les séquences des sous-unités Tbp2 selon l'invention.

D'une manière générale, une séquence additionnelle peut être celle de tout autre polypeptide à l'exclusion de Tbp2.

5 Par exemple, une séquence additionnelle peut être celle d'un peptide signal localisé en position N-terminale d'un polypeptide selon l'invention. Des exemples de séquence signal sont montrés dans les ID SEQ NO 1 à 4. D'autre part, on indique qu'une séquence signal hétérologue appropriée peut être une séquence signal retrouvée chez le précurseur d'une lipoprotéine.

10 Une sous-unité Tbp2 selon l'invention peut être directement purifiée à partir de la souche native ou bien de manière avantageuse, obtenue par voie recombinante dans un système d'expression hétérologue ou homologue. Les polypeptides selon l'invention sont de préférence des produits recombinants. Afin de mettre en oeuvre une expression par voie recombinante, le fragment d'ADN codant pour la Tbp2 de la souche 8680 a été cloné et
15 séquencé.

L'invention a donc aussi pour objet :

- 20 (i) un fragment d'ADN isolé codant pour une sous-unité Tbp2 ou un polypeptide selon l'invention ;
- (ii) une cassette d'expression qui comprend au moins un fragment d'ADN selon l'invention, placé sous le contrôle d'éléments capables d'assurer son expression dans une cellule-hôte appropriée : et
- 25 (iii) un procédé de production d'un polypeptide selon l'invention, selon lequel on cultive une cellule-hôte comportant une cassette d'expression selon l'invention.

30 Dans la cassette d'expression, le fragment d'ADN selon l'invention peut être ou non associé à un bloc d'ADN codant pour un peptide signal hétérologue ou non, au polypeptide codé par ledit fragment d'ADN, selon que l'on recherche ou non la sécrétion du polypeptide. De préférence, cette sécrétion sera recherchée.

35 Des éléments tels qu'un bloc d'ADN codant pour un peptide signal hétérologue (région signal) ou un promoteur existent déjà en assez grand nombre et sont connus de

l'homme du métier. Ses compétences générales lui permettront de choisir une région signal ou un promoteur particulier qui seront adaptés à la cellule-hôte dans laquelle il envisage l'expression.

5 Aux fins du procédé selon l'invention, la cellule-hôte peut être une cellule de mammifère, une bactérie ou une levure ; ces deux dernières étant préférées. Là aussi, le choix d'une lignée particulière est à la portée de l'homme du métier.

10 Enfin, l'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif, une sous-unité Tbp2 ou un polypeptide selon l'invention.

15 Une composition pharmaceutique selon l'invention est notamment utile pour induire une réponse immunitaire chez les humains à l'encontre de *N. meningitidis*, entre autre un effet vaccinal de manière à protéger les humains contre des infections à *N. meningitidis*, en prévention ou en thérapie.

Une composition selon l'invention peut comprendre en outre :

- 20 (i) une sous-unité Tbp2 additionnelle qui dérive d'une souche de *N. meningitidis* dont la sous-unité Tbp2 est reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6 ; ou
- 25 (ii) un polypeptide capable de lier la transferrine humaine et dérivé d'une sous-unité Tbp2 d'une souche de *N. meningitidis* dont la Tbp2 est reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6, notamment par délétion d'un ou plusieurs acides aminés localisés du côté de l'extrémité C-terminale de la sous-unité Tbp2 ; ou
- 30 (iii) une sous-unité Tbp2 additionnelle qui dérive d'une souche de *N. meningitidis* dont la sous-unité Tbp2 n'est pas reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et est reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6 ; ou
- 35 (iv) un polypeptide capable de lier la transferrine humaine et dérivé d'une sous-unité Tbp2 de *N. meningitidis* dont la sous-unité Tbp2 n'est pas reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et est reconnue par un

antisérum anti-RTH B16B6, notamment par délétion d'un ou plusieurs acides aminés localisés du côté de l'extrémité C-terminale de la sous-unité Tbp2.

5 Une composition selon l'invention comprend avantageusement au moins un, de préférence deux éléments additionnels choisis parmi les quatre énoncées ci-avant.

La sous-unité Tbp2 additionnelle de type M982 comprend avantageusement une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 M982, telle que montrée dans l'ID SEQ No. 1, est de 90 à 100 %. Il s'agit de
10 préférence de la sous-unité Tbp2 M982.

La sous-unité Tbp2 additionnelle de type B16B6 comprend avantageusement une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 B16B6, telle que montrée dans l'ID SEQ No. 3, est de 90 à 100 %. Il s'agit de
15 préférence de la sous-unité Tbp2 B16B6.

De préférence, le polypeptide additionnel (ii) dérive d'une sous-unité Tbp2 d'une souche de *N. meningitidis* dont la Tbp2 est reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et n'est pas reconnue par un antisérum
20 anti-RTH B16B6, notamment par délétion partielle du deuxième domaine, entre autre par délétion substantielle des régions hypervariables du deuxième domaine de la sous-unité Tbp2 ou par délétion substantielle du deuxième ou du troisième domaine de la sous-unité Tbp2.

25 Avantageusement, ce polypeptide dérive d'une sous-unité Tbp2 qui comprend une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 M982, telle que montrée dans l'ID SEQ No. 1, est de 90 à 100 %. De manière préférée, il s'agit d'un polypeptide qui dérive de la Tbp2 M982.

30 De préférence, le polypeptide additionnel (iv) dérive d'une sous-unité Tbp2 d'une souche de *N. meningitidis* dont la Tbp2 n'est pas reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et est reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6, notamment par délétion substantielle du deuxième ou du troisième domaine de la sous-unité Tbp2, de préférence des deuxième et troisième domaines.

35

Avantageusement, ce polypeptide dérive d'une sous-unité Tbp2 qui comprend une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 M982, telle que montrée dans l'ID SEQ No. 3, est de 95 à 100 %. De manière préférée, il s'agit d'un polypeptide qui dérive de la Tbp2 B16B6.

5

Selon un mode préféré, une composition selon l'invention comprend :

- 10 (i) un polypeptide qui dérive d'une sous-unité Tbp2 selon l'invention, notamment par délétion partielle du deuxième domaine de la sous-unité Tbp2, entre autre par délétion substantielle des portions hypervariables du deuxième domaine de la sous-unité Tbp2 ;
- 15 (ii) un polypeptide qui dérive d'une sous-unité Tbp2 d'une souche de *N. meningitidis* dont la Tbp2 est reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6, notamment par délétion partielle du deuxième domaine, entre autre par délétion substantielle des portions hypervariables du deuxième domaine de la sous-unité Tbp2 ; et
- 20 (iii) une sous-unité Tbp2 qui dérive d'une souche de *N. meningitidis* dont la sous-unité Tbp2 n'est pas reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et est reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6.

25 Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier on associe le ou les polypeptide(s) selon l'invention avec un adjuvant, un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, en particulier par voie sous-cutanée, par voie intra-musculaire ou par voie intra-veineuse, par exemple sous forme de suspension
30 injectable. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Le dosage approprié varie en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu traité ou du mode d'administration.

35 Afin de déterminer l'objet de la présente invention, on précise que les souches de *N. meningitidis* IM2394 (M982) et IM2169 (B16B6) sont publiquement disponibles auprès de la Collection Nationale de Culture des Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue

du Dr Roux 75015 Paris sous les numéros d'enregistrement respectifs LNP N 1511 et LNP N 1520.

5 L'invention est décrite plus en détails dans les exemples ci-après et par référence aux Figures 1 à 5.

La Figure 1 présentent respectivement les alignements des séquences Tbp2 M982 et 8680. au maximum d'homologie selon le programme Kanehisa (Bisance CITI-2). Le degré d'homologie est de 65%.

10

La Figure 2 présente les alignements au maximum d'homologie des séquences des domaines charnières (deuxième domaine) de Tbp2 M982 (1). 6940 (2), 2223 (3), C708 (4), M978 (5), 1610 (6), 867 (7), S3032 (8) et 981 (9). En italiques est donnée la numérotation de la séquence de Tbp2 M982, telle qu'elle apparaît dans ID SEQ NO 1. En gras
15 apparaissent les séquences des portions hypervariables que l'on peut déléter selon un mode préféré. (C) indique la séquence consensus.

Les Figures 3 à 5 illustrent respectivement la construction des plasmides pTG5782, pTG5755 et pTG5783.

20

EXEMPLE 1 : Purification du RTH de la souche de *N. meningitidis* 8680

1A - Culture

5 Un congelat de la souche *N. meningitidis* 8680 est repris dans environ 1 ml de bouillon Muller Hinton (BMH, Difco). La suspension bactérienne est ensuite étalée sur le milieu solide Muller Hinton contenant du sang cuit (5 %).

10 Après 24 h d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 10 % de CO₂, la nappe bactérienne est recueillie pour ensemer 150 ml de BMH pH 7.2, répartis en 3 erlens de 250 ml. L'incubation est poursuivie pendant 3 h à 37°C sous agitation. Chacune des 3 cultures ainsi réalisées permet d'ensemencer 400 ml de BMH pH 7.2 supplémenté avec 30 µm de Ethylènediamine - Di (O-Hydroxyphenyl - acetic acid (EDDA, Sigma), qui est un agent chélatant du fer sous forme libre.

15 Après 16 h de culture à 37°C sous agitation, les cultures sont contrôlées pour leur pureté par observation au microscope après une coloration de Gram. La suspension est centrifugée, le culot contenant les germes est pesé et conservé à -20°C.

20

1B - Purification

La méthode de purification est essentiellement telle que décrite par Schryvers et al (supra).

25

Le culot bactérien obtenu en 1A est décongelé, puis remis en suspension dans 200 ml de tampon Tris HCl 50 mM, pH 8.0 (tampon A). La suspension est centrifugée pendant 20 min à 15 000 xg à 4°C. Le culot est récupéré, puis remis en suspension dans du tampon A à la concentration finale de 150 g/l. Des fractions de 30 150 ml sont traitées pendant 8 min à 800 bars dans un lyseur de cellules travaillant sous haute pression (Rannie, modèle 8.30H). Le lysat cellulaire ainsi obtenu est centrifugé pendant 15 min à 4°C à 15 000 x g. Le surnageant est récupéré, puis centrifugé pendant 75 min à 4°C à 200 000 x g. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans du tampon A et après dosage de protéines selon Lowry, la 35 concentration de la suspension est ajustée à 5 mg/ml.

5 A 1,4 ml de la suspension de membrane on ajoute 1,75 mg de transferrine humaine biotynylée selon le procédé décrit par Schryvers. La concentration finale de la fraction membranaire est de 4 mg/ml. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C puis centrifugé à 100 000 xg pendant 75 min. à 4°C. Le culot de membranes est repris par le tampon A contenant du NaCl 0,1 M et incubé pendant 60 min. à température ambiante.

10 Après solubilisation, on ajoute à cette suspension un certain volume de N Lauroyl Sarkosine à 30% (p/v) et d'EDTA 500 mM de façon que les concentrations finales en Sarkosyl et EDTA soient de 0,5% et 5 mM respectivement. Après une incubation de 15 min. à 37°C sous agitation, on ajoute 1 ml de résine streptavidine-agarose (Pierce) préalablement lavée en tampon A. La suspension est incubée à 15 min. à température ambiante puis centrifugée à 1 000 x g pendant 10 min. La résine est ensuite conditionnée dans une colonne et l'éluat est éliminé.

15 La résine est lavée par 3 volumes de colonnes de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0.5 % (tampon B) puis par un volume de colonne de tampon B contenant de la guanidine HCl 750 mM. Le récepteur de la transferrine est ensuite élué par le tampon B contenant de la guanidine HCl 2M. L'éluat est collecté en fraction dont le volume correspond à IV, dans des tubes contenant IV de Tris HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 1M. La densité optique à 280 nm de l'éluat est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV.

25 Les fractions correspondant au pic d'élution sont recueillies, dialysées contre du tampon phosphate 10 mM, pH 8.0 contenant du Sarkosyl 0.05 % et lyophilisées. Le lyophilisat est repris dans de l'eau à une concentration 10 fois supérieure. La solution est dialysée une seconde fois contre du tampon phosphate 50 mM pH 8.0 contenant du Sarkosyl 0.05 % (tampon C) puis la solution est filtrée sur une membrane de porosité 0.22 µm.

30 Le contenu en protéines est déterminé et ajusté à 1 mg/ml par addition de tampon C, sous conditions aseptiques. Cette préparation est conservée à -70°C.

EXEMPLE 2 : Purification de la sous-unité Tbp2 de la souche de *N. meningitidis* 8680 par chromatographie hydrophobe

La culture de la souche *N. meningitidis* 8640, ainsi que les étapes de purification
5 allant jusqu'à la préparation de la suspension membranaire sont effectuées dans des conditions identiques à celles décrites dans l'Exemple 1.

A un volume de la suspension de membranes, on ajoute un volume identique de Tris-HCl 50mM pH 8,0 contenant NaCl 2M, EDTA 20 mM, Sarkosyl 1 % (p/v). Le mélange est
10 incubé 15 min à 37°C sous agitation douce. Puis un volume de cette suspension est mis en contact avec un volume identique de résine Sépharose 4B couplée à la transferrine humaine. Cette résine d'affinité a été couplée en greffant de la transferrine humaine (Sigma, St Louis USA) à du Sépharose 4B-CNBr (Pharmacia) selon les recommandations du fabricant. La densité du ligand est de 5 mg transferrine/ml de résine. Le contact se fait en
15 bain pendant 1 h à température ambiante sous agitation rotative douce. La résine est ensuite conditionnée dans une colonne, l'éluat direct est éliminé.

La résine est lavée par 3 volumes de colonnes de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0.5 % (tampon B) puis par un volume de
20 colonne de tampon B contenant de la guanidine HCl 750 mM. Le récepteur de la transferrine est ensuite élué par le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.0 NaCl 1M EDTA 10mM Sarkosyl 0.05 % et guanidine HCl 2M. La densité optique à 280 nm de l'éluat est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV. Les fractions correspondant au pic d'élution sont réunies et la protéine est précipitée par addition de trois volumes d'éthanol refroidi.

25 Après une nuit d'incubation à +4°C, la protéine est recueillie par centrifugation pendant une heure à 10.000 x g. Le précipité est repris par un certain volume de tampon phosphate 10 mM pH 7,0 contenant NaCl 0,5 M, guanidine-HCl 5 M (tampon D) de façon à ce que la concentration finale en protéine soit d'environ 1mg/ml. La solution est mise en
30 contact avec la résine de phényl-Sépharose (Pharmacia) préalablement équilibrée avec le même tampon. L'incubation se fait en bain sous agitation rotative pendant 2 heures à température ambiante. Le gel est ensuite conditionné dans une colonne.

Dans ces conditions, la sous-unité de haut poids moléculaire (Tbp1) est recueillie
35 dans l'éluat direct, tandis que la sous-unité de moindre poids moléculaire (Tbp2) est fixée sur la résine. La colonne est rincée par trois volumes de tampon D puis par 5 volumes de

tampon phosphate 10 mM pH 7,0. Tbp2 est éluée par le tampon phosphate 10mM pH 7,0 contenant 0,5 % de Sarkosyl. L'excès de Sarkosyl contenu dans le tampon d'éluion de Tbp2 est éliminé par précipitation à l'éthanol, la protéine est ensuite reprise dans le tampon phosphate 50 mM pH 8,0 contenant du Sarkosyl 0,05 % (tampon C).

5

La solution est ensuite filtrée sur une membrane de porosité 0,22 µm. Le contenu en protéine est déterminé et ajusté à 1 mg/ml par addition de tampon C, sous conditions aseptiques. Cette préparation est conservée à -70°C.

10

EXEMPLE 3 : Clonage du fragment d'ADN codant pour Tbp2 8680

L'ADN est extrait par une méthode classique au phénol chloroforme. Pour une quantité de germes correspondant à 1 à 2 g de poids humide, le culot est repris par 25 ml de solution de lyse (glucose 50 mM, EDTA, 10 mM, Tris, 25 mM pH 8,0) supplémentée par 1 ml de protéinase K (Sigma) à 10 mg/ml. Le mélange est incubé 10 min à température ambiante, puis 0,5 ml de sarkosyl à 20% sont ajoutés. Ceci est suivi par une incubation de 10 min à 4°C. Après passage de la suspension à travers une aiguille de 18G, 1 ml de RNase A (Sigma) à 2 mg/ml est ajouté puis la suspension est incubée à 37°C pendant 90 min. A l'issue de cette étape, l'ADN est extrait par addition de 0.5 volume de phénol . L'extraction se fait par agitation pendant 10 min, puis 0.5 volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1) sont ajoutés. Après centrifugation du mélange à 5000 tours/min, pendant 15 min le surnageant est prélevé et est de nouveau traité au phénol/chloroforme. L'étape d'extraction au phénol/chloroforme est répétée jusqu'à éclaircissement de la phase aqueuse.

25

A l'issue de l'extraction, l'ADN est précipité par 2 volumes d'éthanol absolu en présence d'acétate de sodium 0,3 M pH 7, puis rincé en éthanol à 70 %. L'ADN est repris dans 1 ml d'eau distillée, puis dosé au spectrophotomètre à 260 nm et à 280 nm. Une unité de DO 260 nm correspond à 50 ng d'ADN/µl. Les préparations d'ADN sont considérées comme satisfaisantes et utilisables si le rapport DO 260/DO 280 est compris entre 1.8 et 2.

30

A partir de 10 ng d'ADN génomique le gène *tbp2* est amplifié Par PCR à l'aide des amorces suivantes :

35

- 5' Inter1 Bam: 5' - CCACGGATCCTGCCGTCTGAAGCCTTATTC - 3'

- 3' Met 2 Eco: 5' -CGCGGATCCTGCTATGGTG-3'

Le milieu réactionnel est comme suit : 10 ng d'ADN génomique ; 0,5 µM d'amorces 5' et 3' ; 200 µM de dNTPs (Boehringer) ; 10 µl de tampon PCR 10x (Biotaq) et 2,5 U de Taq polymérase (Biotaq). Le volume réactionnel est ajusté à 100 µl avec de l'eau distillée. Les conditions d'amplification dans un appareil Trioblock (Biolabs) sont les suivantes : dénaturation : 94°C, 1 min ; hybridation : 58°C, 2 min ; élongation : 72°C, 3 min ; nombre de cycles : 25.

Le fragment d'ADN amplifié par PCR est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose préparatif 1% ("Electrophoresis grade". BRL) est préparé en tampon TAE (Tris acétate 0,04M, EDTA 0,002M pH 8,0). La bande amplifiée correspondant au gène *tbp2* est découpée. L'ADN contenu dans l'agarose est purifié à l'aide d'un kit Geneclean (Bio 101). L'ADN est ensuite digéré par *EcoRI* et *BamHI* pendant 2h à 37°C. L'ADN digéré est ensuite repurifié par extraction au phénol/chloroforme, précipité par 2 volumes d'éthanol, puis repris par 20 µl de tampon Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0).

Le vecteur pBSK (-) (Stratagène) est digéré par *EcoRI* et *BamHI* puis purifié comme décrit ci-avant pour l'insert *EcoRI/BamHI*.

L'insert *EcoRI/BamHI* et pBSK sont ligués en présence de ligase T4 (Boehringer) à 16°C pendant la nuit dans les conditions suivantes : vecteur 100 ng; insert 200-300 ng; tampon T4 ligase 10X (Boehringer) 1 µl; ligase 5U; eau qsp 10 µl.

E. coli XL1-Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, (F' proAB, *lacZ*ΔM15, Tn10 (*tet^r*)) est pré-cultivée dans 10 ml de milieu SB (Difco) en présence de tétracycline à 10 µg/ml pendant une nuit à 37°C. 500 µl de pré-culture sont utilisés pour ensemer 11 de milieu SB. Lorsque la culture atteint la phase exponentielle (DO 600 nm = 0,8), les germes sont lavés trois fois en glycérol 10% en eau en diminuant les volumes de lavage de 500 ml à 120 ml. Le surnageant est éliminé après centrifugation à 2500 x g pendant 15 min à 4°C. Après le dernier lavage, les bactéries sont reprises dans 3 ml de glycérol 10%, 1 mM Hepes pH 7,5. Les germes sont aliquotés sous 100 µl dans des tubes placés dans de l'azote liquide. Les bactéries électrocompétentes sont conservées pendant un mois à -70°C.

Cinq µl de la réaction de ligation sont utilisés pour transformer 100 µl de bactéries *E.coli* XL-1 par électroporation dans des cuves de 2 mm d'épaisseur (Eurogentec) sous un voltage de 2500 volts. Après électroporation, les germes sont incubés 1 heure à 37°C puis 1/10 et 9/10 du volume de la préparation sont étalés sur des boîtes de milieu LB (Difco) plus ampicilline (100 µg/ml) supplémenté avec du X-gal (25 µg/ml) et de l'IPTG (25 µg/ml) permettant une sélection blanc/bleu des clones recombinants.

Les clones recombinants (blancs) sont analysés après mini-préparation de plasmide selon une méthode classique (Maniatis *et al.*, 1989) par double digestion *Eco*R1, *Bam*HI. Les clones retenus sont ceux qui ont intégrés un fragment de 2,1 kb. Le sens d'intégration de l'insert est déterminé après digestion par *Hinc*II. L'ADN plasmidique des clones d'intérêt est préparé en quantité importante par une maxi-préparation en utilisant une méthode de purification sur colonne tip-250 (Kit Quiagen).

L'ADN plasmidique purifié sur colonne (Quiagen) est séquencé en utilisant le kit Sequenase (USB, version 2.0). Cette technique dérive de la méthode de séquençage décrite par Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Trois à cinq µg d'ADN sont utilisés par réaction de séquence. Les réactions de séquences sont chargées sur un gel d'acrylamide 6% en présence d'urée 8M. La séquence nucléotidique révélée et la séquence d'acides aminés déduite sont telles que montrées dans l'ID SEQ N° 5.

EXEMPLE 4 : Polypeptide T/2169 (1, O2, Δ3 ; 1-350) dont la séquence telle que montrée dans l'ID SEQ NO 1 (IM2169), de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 350.

**4A - Préparation du fragment d'ADN codant pour T/2169 (1-350) :
Construction du vecteur pTG 5782.**

A partir du plasmide pTG3721 décrit dans la demande EPA 586 266, on introduit, par mutagenèse dirigée, un site de restriction *Hind*III en aval de la séquence codant pour Tbp2, pour générer le plasmide pTG4704.

A partir du plasmide pTG3721, on amplifie par PCR, à l'aide des amorces OTG4915 et OTG4651, un fragment comportant la séquence codant pour le signal de

sécrétion de RlpB et du début de la séquence codant pour Tbp2 mature jusqu'au site *HaeII* interne.

5 OTG4915 : AAACCCGGATCCGTTGCCAGCGCTGCCGT
HaeII

OTG4651 :
BspHI
TTTTTTCATG AGA TAT CTG GCA ACA TTG TTG TTA TCT CTG
10 Met Arg Tyr Leu Ala Thr Leu Leu Leu Ser Leu

GCG GTG TTA ATC ACC GCC GGG TGC CTG GGT GGC
Ala Val Leu Ile Thr Ala Gly Cys Leu Gly ...
_clivage du peptide signal
15

GGC GGC AGT TTC

20 Le fragment PCR est ensuite digéré par *BspHI* et *HaeII* et inséré simultanément avec le fragment *HaeII-HindIII* de pTG4704 qui comporte la partie 3' de la région codant pour Tbp2, dans le plasmide pTG3704 décrit dans la demande EPA 586 266, digéré par *NcoI* et *HindIII*, pour générer le plasmide pTG5768.

25 A partir de plasmide pTG3721, on amplifie par PCR, à l'aide des amorces OTG4928 et OTG5011, un fragment comportant la séquence codant pour la partie N-terminale de Tbp2.

SphI
OTG4928 : GTG TTT TTG TTG AGT GCA TGC CTG GGT GGC
Val Phe Leu Leu Ser Ala Cys Leu Gly Gly
30 _Clivage du peptide
signal

OTG5011 : TGCGCAAGCTTACAGTTTGTCTTTGGTTTTTCGCGCTGCCG
HindIII
35

Ce fragment PCR est digéré par *SphI* et *HindIII*, puis cloné dans le plasmide pTG4710 décrit dans la demande EPA 586 266 ; on génère ainsi le plasmide pTG5740.

5 Le fragment *HaeII-HindIII* de pTG5740 comportant la partie 3' de la séquence codant pour le domaine de liaison à la transferrine humaine (hTf) (3' de la région codant pour le premier domaine) est inséré dans le plasmide pTG3704 digéré par *BamHI* et *HindIII*, simultanément avec le fragment *BamHI-HaeII* de pTG5768 comportant le promoteur *araB*, la séquence signal *rlpB* et le début de la séquence
10 codante de Tbp2 ; on génère ainsi le plasmide pTG5782. Ce vecteur comporte le promoteur *araB*, la séquence codant pour le signal de sécrétion de RlpB fusionnée à la séquence codant pour le domaine N-terminal de Tbp2 (1 - 350).

4B - Production et purification de T/2169 (1-350)

15 Une souche d'*E. coli* est transformée par pTG5782. Les transformants sont mis en culture à 37°C en milieu M9 + succinate 0.5% + arginine 50µg/ml + ampicilline 100 µg/ml. En phase exponentielle, on ajoute 0.2% d'arabinose (inducteur). Après une heure d'induction, on prélève des cellules et des extraits sont
20 préparés. Une analyse en Western Blot suivie d'une révélation par la hTF-peroxidase permet de détecter une bande majoritaire dont le P.M. correspond à celui attendu pour cette forme tronquée de Tbp2.

25 Dans un test tel décrit dans l'exemple 4 de WO93/6861 (publié : 15. 04. 93) T/2169 purifié se révèle capable d'induire des anticorps bactéricides et par conséquent devrait être utile à des fins vaccinales.

EXEMPLE 5 : Polypeptide T/2394 (1, O2, Δ3 ; 1-340) dont la séquence telle que montrée dans l'ID SEQ NO 2 (IM2394), de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 340.

5 **5A - Préparation du fragment d'ADN codant pour T/2394 (1-340) :
Construction du vecteur pTG 5755**

10 A partir du plasmide pTG4710 décrit dans la demande EPA 586 266, on amplifie par PCR, à l'aide des amorces OTG4873 et OTG4877, un fragment comportant la région codant pour la partie C-terminale du domaine de liaison à la hTf. Ce fragment est ensuite digéré par *MluI* et *HindIII*.

OTG4873 : AAAAAGCATGCATAAAACTACGCGTTACACCATTTCAAGC
MluI

15 OTG4877 : TATATAAAGCTTACGTTGCAGGCCCTGCCGCGTTTTCCCC
HindIII

20 Le plasmide pTG4710 est digéré par *MluI* et *HindIII*. Le fragment *MluI*-*HindIII* comportant la partie 3' de la séquence codant pour Tbp2 est remplacé par le fragment PCR codant pour la partie C-terminale du domaine de liaison à la hTf. On génère ainsi le plasmide pTG5707. On remplace ensuite dans le plasmide pTG5707, un fragment *BamHI*-*MluI* comportant le promoteur *araB* et le début de la séquence codant pour Tbp2, par un fragment *BamHI*-*MluI* de pTG4764 décrit dans la demande
25 EPA 586 266 qui comporte le promoteur *araB*, la séquence codant pour le signal de sécrétion RlpB fusionnée à la séquence codant pour le domaine N-terminal de Tbp2. On génère ainsi le plasmide pTG5755. Ce vecteur comporte le promoteur *araB*, la séquence codant pour le signal de sécrétion de RlpB fusionnée à la séquence codant pour le domaine N-terminal de Tbp2 (1 - 340).

30

5B - Production et purification de T/2394 (1-340)

T/2394 (1-340) est produit et purifié tel que décrit dans l'Exemple 4B.

Dans un test tel décrit dans l'exemple 4 de WO93/6861 (publié : 15. 04. 93) T/2394 purifié se révèle capable d'induire des anticorps bactéricides et par conséquent devrait être utile à des fins vaccinales.

5

EXEMPLE 6 : Polypeptide D4/2169 (1, O2, 3) dont la séquence est identique à celle telle que montrée dans l'ID SEQ NO 1, de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 691, déletée des régions 362-379, 418-444, 465-481 et 500-520.

10

Polypeptide D4/2169 (1, O2, 3) dont la séquence est identique à celle telle que montrée dans l'ID SEQ NO 1, de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 691, déletée des régions 362-379, 418-444, 465-481 et 500-520.

15

6A - Préparation du fragment d'ADN codant pour D4/2169

1.1. Clonage du fragment d'ADN

20

Le fragment d'ADN codant pour la sous-unité Tbp2 de la souche de *N. meningitidis* IM2169 est amplifié par PCR (Polymerase chain reaction) à l'aide d'amorces spécifiques complémentaires des régions 5' et 3', (respectivement A5' et A3') sur 10 ng d'ADN génomique extrait d'une culture de bactéries de la souche IM2169.

25

A5' : 5' CCCGAATTCTGCCGTCTGAAGCCTTATTC 3'

A3' : 5' CCCGAATTCTGCTATGGTGCTGCCTGTG 3'

30

Un fragment d'ADN est ainsi obtenu et après digestion par *EcoRI*, il compte 2150 nt. Ce fragment *EcoRI* est ensuite ligué aux extrémités *EcoRI* déphosphorylées du phagemide pBluescriptSK(-) (Stratagene) pour donner le phagemide recombinant pSK/2169tbp2.

1.2. Mise en oeuvre des délétions.

Le clone pSK/2169tbp2 contenant les séquences *tbp2* de la souche M982 est délété par la technique de Kunkel, PNAS (1985) 82 : 448.

5

En bref, la forme phagique du phagemide recombinant pSK/2169tbp2 est obtenue après sauvetage par le phage "helper" VCS M13 selon la technique décrite par Stratagene, fournisseur du vecteur de base, et utilisée pour infecter la souche bactérienne CJ236. Les mutations *dut* et *ung* portées par la souche CJ236 ont pour conséquence la synthèse de molécules d'ADN ayant incorporé le précurseur nucléotidique dUTP.

10

Les phages sont récoltés et l'ADN simple brin est extrait par un mélange phénol/chloroforme. Cet ADN est hybridé dans les conditions classiques, aux oligonucléotides suivants :

15

2169d1 : 5' CGCATCCAAAACCGTACCTGTGCTGCCTGA 3'
2169d2 : 5' TTTATCACTTTCCGGGGGCAGGAGCGGAAT 3'
2169d3 : 5' GTTGGAAACAGCAGACAGCGGTTTGC GCCCC 3'
2169d4 : 5' GAACATACTTTGTTTCGTTTTTGC GCGTCAA 3'

20

La réaction d'hybridation est poursuivie 30 min. en température décroissante à partir de 70°C jusqu'à 30°C.

25

Le second brin complémentaire est ensuite achevé par synthèse complète en présence des quatre desoxynucléotides, de la T4 DNA polymérase et de la T4 DNA ligase, selon les conditions classiques.

30

La souche *E. coli* SURE (Stratagene) est transformée par l'ADN ainsi obtenu. Dans cette souche, les molécules porteuses de dUTP, c'est-à-dire non-mutées, sont détruites.

35

Les phages obtenus sont analysés par les techniques classiques de préparation rapide d'ADN plasmidique et de digestion par les enzymes de restriction appropriées. La présence de la mutation recherchée est ensuite vérifiée par séquençage nucléotidique.

Le clone pSK2169#7, porteur des quatre mutations Δ 1203-1256, Δ 1371-1451, Δ 1512-1562, et Δ 1617-1679 est sélectionné.

6B - Construction du vecteur d'expression pTG5783

5

Le plasmide pTG5768 décrit précédemment est digéré par *HpaI* et *XcmI*. On insère simultanément dans ce vecteur un fragment *XcmI-XcmI* de pTG5768 et le fragment *HpaI-XcmI* du plasmide pSK/2169ed#7, pour générer le plasmide pTG5783. Ce vecteur comporte le promoteur *araB*, la séquence codant pour le signal de sécrétion de RlpB fusionnée à la séquence *tbp2* modifiée (délétions d1 à d4).

10

6C - Préparation et purification de D4/2169.

D4/2169 est produit et purifié selon l'Exemple 4B.

15

Dans un test tel décrit dans l'exemple 4 de WO93/6861 (publié : 15. 04. 93) D4/2169 purifié s'est révélé capable d'induire des anticorps bactéricides et par conséquent devrait être utile à des fins vaccinales.

20

EXEMPLE 7 : Détermination du niveau d'expression des RTHs des souches de *N. meningitidis*

Le taux d'expression de la protéine RTH par *N. meningitidis* est déterminé par la mesure de la capacité d'un nombre défini de germes à fixer la Tfh couplée à la peroxydase.

25

Une préculture de 18 heures à 37°C sur MHA sert àensemencer un erlen contenant 50 ml de MHB supplémenté avec 30 μ M d'EDDA. La densité optique est mesurée à 600 nm au début de de la culture et après 5 heures de culture. on appelle croissance, la différence de densité optique entre ces deux temps. L'expression du RTH est mesurée après 5 heures de culture comme suit :

30

La densité bactérienne de la culture est calculée à partir de l'absorbance de la suspension mesurée à 600 nm sachant qu'une unité d'absorbance correspond à 3.10^9 CFU/ml.

35

Un ml d'une culture bactérienne est centrifugé pendant 15 min à 2500 g puis le culot bactérien est repris par un volume de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 de façon à obtenir une suspension de 1.10^8 CFU/ml. Dans le même tampon une série de dilutions de raison 2 est effectuée à partir de cette suspension (1/2 à 1/2048). Cinquante μ l de chacun de ces échantillons sont déposés dans chacun des puits d'un appareil de "dot-blot" (Biorad) fonctionnant sous vide et équipé d'une membrane de nitrocellulose 0,45 μ m (Schleicher et Schull) préalablement imbibée de tampon. Après dépôt des échantillons la membrane est incubée pendant 1h à température ambiante en tampon bloquant (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 9g/l, lait écrémé 10 g/l). La membrane est ensuite incubée pendant 1h à 37°C sous agitation avec une solution de Tfh-peroxydase à 1 μ g/ml en tampon bloquant. Après trois lavages en tampon bloquant, la fixation de la Tfh-peroxydase est révélée par l'addition d'un substrat colorimétrique de la peroxydase, le 4-Chloro-1-Naphtol (4-Cl-N) à 0,01% dans de l'éthanol 1%.

Après 20 min d'incubation à température ambiante, le titre d'expression du RTH est déterminé: il correspond à l'inverse de la dernière dilution pour laquelle une coloration violette est encore visible. La lecture se fait soit visuellement soit en utilisant un densitomètre (Appareil Sebia-Preference).

20

EXEMPLE 8 : Préparation et titrage des sérums hyperimmuns anti-Tbp2s recombinantes (Tbp2M982 100 %, Tbp2 M982 80 % et Tbp2 M982 50 %), anti-RTH M982 et anti-RTH B16B6

25

8A - Préparation des immunogènes

Une culture de la souche d'*E. coli* décrite dans l'Exemple 4B ci-avant ou dans l'Exemple 6B ci-avant est lysée par passage dans un appareil de lyse (Rannie) puis centrifugée. Le matériel insoluble est chargé sur un gel d'acrylamide 10% de 5 mm d'épaisseur (10 mg de protéines insolubles par gel) puis soumis à électrophorèse. La protéine Tbp2 ainsi que les formes 80 et 50 % sont visualisées par coloration au Bleu de Coomassie puis extraites du gel. En parallèle, on réalise un témoin négatif correspondant à l'extraction d'une protéine d'*E. coli* de même taille que la protéine Tbp2.

35

Les RTH M982 et B16B6 sont quant à eux purifiés comme décrit dans les Exemples 1 et 2 de WO 93/6861.

8B - Préparation des antisérums

5

Des lapins néozélandais albinos reçoivent par voie sous-cutanée multisite, 50 µg d'un des produits décrit ci-avant dans le présent exemple, en présence d'adjuvant complet de Freund. 21 jours et 42 jours après la première injection, les lapins reçoivent à nouveau 50 µg du même produit mais ces fois-ci en présence d'adjuvant incomplet de Freund. 15 jours après la dernière injection, le sérum de animaux est prélevé, puis décomplémenté pendant 30 min à 56°C et stérilisé par filtration sur membrane de porosité 0,22 µm (Millipore).

15

Lorsque l'immunogène mis en oeuvre est un RTH, le filtrat est par la suite épuisé par contact avec la souche initiale (M982 ou B16B6) qui pour se faire, a été cultivée au préalable en présence de fer sous forme libre (dans ces conditions, la synthèse du récepteur de la transferrine est réprimée). Les modalités de contact sont comme suit : 10 ml du filtrat sont ajoutés à 10^{10} cfu (unités formant des colonies) d'une culture de la souche initiale. L'adsorption est poursuivie une nuit à 4°C, sous agitation. Les bactéries sont ensuite éliminées par centrifugation de 15 min à 2500 x g. Le surnageant est récupéré puis soumis à nouveau à 3 opérations d'adsorption successives comme précédemment décrit. Les sérums adsorbés sont filtrés sur une membrane de porosité 0.22 µm (Millipore) et conservés à -20°C.

20

25

Dans le cas des sérums dirigés contre des protéines Tbp2 recombinantes, l'adsorption s'effectue contre la souche d'*E. coli* qui a servi à produire les protéines recombinantes, cultivées pendant 5h en milieu LB (Difco) supplémenté en ampicilline à 100 µg/ml.

30

8C - Titrage de l'activité bactéricide des sérums

35

La capacité des sérums anti-RTH ou anti-Tbp2 à induire la lyse des différentes souches de *N. meningitidis* est évaluée par un essai de bactéricidie. Cette technique consiste à mettre en présence deux volumes des dilutions de raison 2 (1/4 à 1/2048) du sérum adsorbé et décomplémenté à titrer, un volume de complément de jeune lapin dilué au 1/1.5 et un volume de suspension bactérienne contenant 70 germes issue d'une

culture de 5h à 37°C en bouillon MHB pH 7,2, EDDA 30 µM. Les réactifs sont mélangés les uns aux autres dans des cupules et incubés pendant 30 min à 37°C sous agitation. La réaction de bactéricidie du sérum vis à vis des germes est arrêtée par l'addition d'1 ml de gélose constituée de bouillon MH pH 7,2, de 20% de supplément G (Pasteur Diagnostic) et 15% d'agar noble (Difco). Les cupules sont ensuite incubées pendant une nuit à 37°C en présence de 10% CO₂. La lecture des résultats consiste à numérer les colonies formées à partir des bactéries non lysées. Le titre est défini comme l'inverse de la dernière dilution du sérum induisant la lyse de 50% des bactéries introduites initialement.

8D - Caractérisation des sérums anti-Tbp2s M982 recombinantes

La spécificité de quatre sérums hyperimmuns dirigés respectivement contre une protéine Tbp2-100% (sérum 577), Tbp2-80% (580), Tbp2-50% (583) ou encore contre une protéine non-sens d'*Escherichia coli* (sérum témoin 582) est analysée soit par une méthode de "dot-blot" sur germes entiers, soit par la méthode de "western-blot" sur des protéines de membranes externes.

1.1. Analyse sur des germes entiers

La préparation des germes, leur dépôt sur membrane de nitrocellulose sont identiques à ce qui a été décrit dans l'Exemple 9. M982 et B16B6 sont cultivées en absence ou en présence d'agent chélatant.

Après l'étape de saturation en tampon bloquant, la membrane est incubée avec un des différents sérums hyperimmuns à analyser (dilué en tampon bloquant: dilutions allant de 1/500 à 1/10000) pendant 1 h à 37°C. La membrane est ensuite lavée deux fois en tampon bloquant sous agitation forte puis, afin de révéler le premier sérum, elle est de nouveau incubée avec un sérum de chèvre anti IgG de lapin couplé à la peroxydase (Zymed) dilué au 1/1000 en tampon bloquant. Pour augmenter la sensibilité de la détection du signal, le substrat de la peroxydase utilisée est un substrat chimioluminescent (Kit ECL, Amersham) utilisé selon les recommandations du fabricant.

Les résultats que l'on obtient, indiquent que le sérum anti-protéine d'*E. coli* (sérum 582) est un bon témoin négatif dans le sens où il ne permet de détecter ni la souche M982, ni la souche B16B6 quelque soit les conditions de culture. Les

trois autres sérums reconnaissent uniquement la souche M982 et à un niveau plus élevé quand elle est cultivée en présence d'EDDA ce qui correspond à une reconnaissance du RTH. En effet la souche M982 exprime le RTH à un niveau basal quand elle est cultivée en l'absence d'agent chélatant et ce niveau augmente en présence d'agent chélatant. Les résultats indiquent que les sérums anti-Tbp2 100% (577), anti-Tbp2 80% (580) et anti-Tbp2 50% (583) sont spécifiques du RTH de la souche M982.

1.2. Analyse sur des protéines de membranes externes

La souche M982 est cultivée en milieu appauvri en fer. Cinq ml de la culture en phase exponentielle (environ 1.10^8 germes/ml) sont centrifugés à 1500 g pendant 15 min. Le culot est repris par 1,5 ml de Tris-HCl 125 mM, pH 8,0. La suspension est lysée par sonication (appareil Branson-Sonifer 450, sonde de 3 mm de diamètre) pendant 2 min. La lyse est poursuivie par addition de Triton X100 à 1% final et incubation 30 min dans de la glace. La suspension est centrifugée à 8000 g pour éliminer les bactéries non lysées, puis le surnageant est centrifugé 30 min à 10000 g pour obtenir sous forme de culot les membranes externes. Le culot est repris en Tris-HCl 125 mM, pH 8,0, puis dosé en protéines par une microméthode (Kit Micro-BCA, Pierce) utilisée selon les recommandations du fabriquant.

Une électrophorèse est réalisée sur gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Le gel séparateur contient 12,5% d'acrylamide et le gel de concentration en contient 5 %. Les échantillons à analyser sont dilués au demi en tampon échantillon (0,125 M de tampon Tris à pH 6,8; 25 % de glycérol; 2,5 % de 2-Mercaptoethanol; 0,001 % de bleu de Bromophénol) et hydrolysés à 100°C. Cinquante µg de protéines sont déposés pour un grand gel et 1 µg pour les gels Phast (Pharmacia, réticulation 12,5%). La migration est réalisée à un voltage constant 50 V pour des gels de 15x12 cm (appareil vertical Biorad) et de 250 V sur les gels Phast .

Après une étape de fixation de 30 min dans une solution d'acide acétique 10%, isopropanol 25%, les gels sont colorés au bleu de Coomassie (0,25 % bleu; 45% méthanol; 10% acide acétique). Les gels sont ensuite décolorés

progressivement dans des bains successifs de méthanol 20%, acide acétique 10%.

5 Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schull ; 0,45 μ m) selon la méthode de Towbin (Towbin *et al.*, 1979). Le transfert se fait sous ampérage constant (1 mA/cm²) pendant 90 min pour un grand gel et 1 heure pour un gel Phast. L'efficacité du transfert est révélée par coloration au rouge Ponceau (Kodak). Après transfert, la nitrocellulose est lavée en tampon bloquant (Tris-HCl 0,5 M pH 7.5 ; 1 % lait écrémé ; 150 mM NaCl) pendant 1 heure à température ambiante.

10 L'incubation avec l'antisérum dilué en tampon bloquant a lieu pendant une heure à 37°C. Le premier sérum est révélé par un antisérum couplé à la peroxydase (chèvre anti-lapin, Zymed) pendant une heure à 37°C. Le substrat de la peroxydase est le 4-chloro1-naphtol à 1 % (coloration violette).

15 Les résultats obtenus indiquent que la protéine Tbp2 de la souche M982 est spécifiquement reconnue par les sérums anti-Tbp2 100%), anti-Tbp2 80% et anti-Tbp2 50%. Aucune autre protéine de *N. meningitidis* n'est reconnue par ces sérums. Le sérum anti-protéine d'*E. coli* ne reconnaît pas la Tbp2 de la souche *N. meningitidis* M982.

8E - Titrage des sérums anti-Tbp2 M982 recombinantes

25 Pour pouvoir comparer les sérums hyperimmuns anti-Tbp2 100, 80 et 50 % adsorbés sur *E. coli*, il est nécessaire de connaître leur titre vis à vis de la souche homologue. C'est pourquoi un titrage en "dot-blot" sur des germes M982 cultivés en milieu appauvri en fer est réalisé en appliquant le protocole décrit en 9.D.2.

30 Une concentration identique de germes (1.10^8 germes/ml) est déposée sur des filtres de nitrocellulose qui sont ensuite révélés avec des dilutions de raison 2 des différents sérums à titrer. Les titres sont définis comme l'inverse de la dernière dilution pour laquelle un signal positif est observé. Avec une révélation colorimétrique les titres obtenus sont les suivants: 512 pour le sérum anti-Tbp2 100% (sérum 577); 256 pour le sérum anti-Tbp2 80% (sérum 580); 256 pour le sérum anti-Tbp2 50% (sérum 583)

Ceci indique que les trois sérums hyperimmuns anti-Tbp2 100, 80 et 50 % ont à une raison 2 près le même titre vis à vis de la souche M982. De ce fait pour l'analyse de leur réactivité croisée vis à vis de différentes souches type M982, ils peuvent être utilisés à la même concentration.

5

EXEMPLE 9 : Analyse de la réactivité croisée des sérums anti-Tbp2 M982 recombinantes

10 La détermination du niveau de réactivité croisée vis à vis des souches de type M982 est mise en oeuvre par la méthode de dot blot comme décrit dans l'Exemple 8.

Après culture en milieu MHB + 30mM EDDA pendant 5 heures, des dilutions de raison 2 des différentes suspensions bactériennes sont déposées sur 5 filtres de nitrocellulose
15 différents :

- un premier filtre est révélé avec de la transferrine humaine couplée à la peroxydase (TGH) et permet de définir un titre de fixation de la TFH ;
- 20 - le second est révélé avec un sérum anti-protéine d'*E. coli* (sérum utilisé au 1/2000e ; témoin négatif) ;
- le troisième est révélé avec un sérum dirigé contre une protéine Tbp2 M982 recombinante entière (100%) ;
- 25 - le quatrième est révélé avec un sérum dirigé contre une protéine Tbp2 M982 recombinante délétée des portion hypervariables de la région "charnière" (80%) ;
et
- 30 - le cinquième est révélé avec un sérum dirigé contre une protéine Tbp2 M982 recombinante correspond à la région 50% N-terminale. Les titres sont définis comme l'inverse de la dernière dilution pour laquelle une coloration est visible.

Pour pouvoir quantifier la réactivité croisée de chacun des sérums avec chacune des
35 souches, il est nécessaire de définir une valeur qui tienne compte de la variabilité du niveau d'expression du RTH parmi les souches analysées.

C'est pourquoi un index correspondant au titre sérique rapporté au titre d'expression de la transferrine est calculé. Cet index est la valeur retenue pour l'analyse car elle tient compte du niveau variable d'expression du RTH d'une souche à l'autre dans nos conditions de culture. Cependant cet index ne peut pas rendre compte d'une éventuelle différence d'affinité des RTH.

Pour information, on présente dans le tableau ci-dessous un récapitulatif des valeurs d'index obtenus pour les 54 souches.

Index de reconnaissance sérique	Nombre de souches reconnues		
	Anti-Tbp2 100% sérum 577	Anti-Tbp2 80% sérum 580	Anti-Tbp2 50% sérum 583
0	14	4	1
0.016	0	1	1
0.031	6	3	1
0.062	10	8	5
0.125	5	10	7
0.25	5	9	12
0.5	5	8	9
1	7	4	5
2	2	4	8
4	0	3	2
8	0	0	3

EXEMPLE 10 : Etude de bactéricidie croisée

10A. Préparation d'un antisérum anti-RTH de *N. meningitidis* 8680

Une préparation de RTH 8680 telle qu'obtenue dans l'Exemple 1 est utilisée comme immunogène afin de préparer un antisérum selon le protocole décrit dans l'Exemple 8B.

10B. Culture des souches

Les souches *N. meningitidis* 92/04, M871, 504/91, 8680, 8726, BZ83, 44, 52 et 8710 (souches provenant du laboratoire de référence des méningocoques : Dr. Caugant, WHO-collaborationg center for reference and research on meningococci, NIPH, Oslo, Norway ; et faisant partie du groupe électrophorétique ET5 (B. Mohamed-Rokbi, Thèse présentée le 10 octobre 1995, devant l'Université Claude Bernard, Lyon, France pour l'obtention du diplôme de Doctorat) ainsi que les souches M982 et B16B6 sont cultivées comme décrit dans l'Exemple 1A.

10C. Test de bactéricidie

L'activité bactéricide de l'antisérum préparé en 10A est testée à l'encontre des souches cultivées en 10B selon le protocole décrit dans l'Exemple 8C.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après :

Souche	Sérotype / sous type	Titre Bactéricide	
		Lapin 1	Lapin 2
B16B6	B : 2a : P1.2	<4	nd
M982	B : 9 : P1.9	<4	<4
92/94	B : 15 : P1.7, 9, 16	128	32
M871	B : 15 : P1.7, 16	256	32
504/91	B : 4 : -	512	128
8680	B : 15 : P1.3	1024	256
8726	B : 4 : P1.3	1024	256
BZ83	B : 15 : -	32	64
44	nd	64	<4
52	nd	16	16
8710	B : 15 : P1.3	256	64

Les titres de bactéricidie obtenus à l'encontre des souches du groupe électrophorétique ET5 mettent en évidence une bactéricidie croisée. Ceux obtenus à

l'encontre des souches B16B6 et M982 par contre témoignent d'une absence de bactéricidie croisée.

5 Ces résultats tendent à supporter la proposition faite par la présente demande, à savoir l'ajout éventuel d'une protéine Tbp2 ou d'un RTH qui dérive d'une souche de type 8680, à une composition vaccinale contenant (i) une Tbp2 ou un RTH qui dérive d'une souche de type M982 et (ii) une Tbp2 ou un RTH qui dérive d'une souche de type B16B6 ; ceci sans préjudice porté aux résultats déjà constatés en matière de reconnaissance de la souche 8680 en Western blot, par les antisérums anti-RTH
10 M982 et anti-RTH B16B6.

ID SEQ NO	Nom du Projet	Séquence
1, 2	IM2169-2	Tbp2 IM2169 complète
3, 4	IM2394-2	Tbp2 IM2394 complète
5, 6	8680	Tbp2 8680 complète
7	2D IM2169	2ième domaine de Tbp2 IM2169
8	2D6940	2ième domaine de Tbp2 6940
9	2D2223	2ième domaine de Tbp2 2223
10	2D 708	2ième domaine de Tbp2 708
11	2D M978	2ième domaine de Tbp2 M978
12	2D 1610	2ième domaine de Tbp2 1610
13	2D867	2ième domaine de Tbp2 2D867
14	2D S3032	2ième domaine de Tbp2 S3032
15	2D891	2ième domaine de Tbp2 M981
16	OTG 4915	OTG 4915
17	OTG 4651	OTG 4651
18	OTG 4928	OTG 4928
19	OTG 5011	OTG 5011
20	OTG 4873	OTG 4873
21	OTG 4877	OTG 4877
22	A 5'	A 5'
23	A 3'	A 3'
24	2169 D1	2169 D1
25	2169 D2	2169 D2
26	2169 D3	2169 D3
27	2169 D4	2169 D4
28	Inter 1 Bam	Inter 1 Bam
29	Met 2 Eco	Met 2 Eco

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Pasteur Merieux serums et vaccins
- (B) RUE: 58, avenue leclerc
- (C) VILLE: Lyon
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 69007

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Fragments Tbp2 de N. meningitidis

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 29

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2230 paires de bases
- (B) TYPE: nucl,otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: IM2169

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: sig_peptide
- (B) EMPLACEMENT:60..119

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: mat_peptide
- (B) EMPLACEMENT:120..2192

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT:60..2192

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:120..1154

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:1155..1748

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature
(B) EMPLACEMENT:1749..2192

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_binding
(B) EMPLACEMENT:237..1169

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATTTGTTAAA AATAAATAAA ATAATAATCC TTATCATTCT TTAATTGAAT TGGGTTTAT	59
ATG AAC AAT CCA TTG GTA AAT CAG GCT GCT ATG GTG CTG CCT GTG TTT	107
Met Asn Asn Pro Leu Val Asn Gln Ala Ala Met Val Leu Pro Val Phe	
-20 -15 -10 -5	
TTG TTG AGT GCC TGT CTG GGC GGC GGC GGC AGT TTC GAT CTT GAT TCT	155
Leu Leu Ser Ala Cys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Phe Asp Leu Asp Ser	
1 5 10	
GTC GAT ACC GAA GCC CCG CGT CCC GCG CCA AAG TAT CAA GAT GTT TCT	203
Val Asp Thr Glu Ala Pro Arg Pro Ala Pro Lys Tyr Gln Asp Val Ser	
15 20 25	
TCC GAA AAA CCG CAA GCC CAA AAA GAC CAA GGC GGA TAC GGT TTT GCG	251
Ser Glu Lys Pro Gln Ala Gln Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Gly Phe Ala	
30 35 40	
ATG AGG TTG AAA CGG AGG AAT TGG TAT CCG GGG GCA GAA GAA AGC GAG	299
Met Arg Leu Lys Arg Arg Asn Trp Tyr Pro Gly Ala Glu Glu Ser Glu	
45 50 55 60	
GTT AAA CTG AAC GAG AGT GAT TGG GAG GCG ACG GGA TTG CCG ACA AAA	347
Val Lys Leu Asn Glu Ser Asp Trp Glu Ala Thr Gly Leu Pro Thr Lys	
65 70 75	
CCC AAG GAA CTT CCT AAA CGG CAA AAA TCG GTT ATT GAA AAA GTA GAA	395
Pro Lys Glu Leu Pro Lys Arg Gln Lys Ser Val Ile Glu Lys Val Glu	
80 85 90	
ACA GAC GGC GAC AGC GAT ATT TAT TCT TCC CCC TAT CTC ACA CCA TCA	443
Thr Asp Gly Asp Ser Asp Ile Tyr Ser Ser Pro Tyr Leu Thr Pro Ser	
95 100 105	
AAC CAT CAA AAC GGC AGC GCT GGC AAC GGT GTA AAT CAA CCT AAA AAT	491
Asn His Gln Asn Gly Ser Ala Gly Asn Gly Val Asn Gln Pro Lys Asn	
110 115 120	
CAG GCA ACA GGT CAC GAA AAT TTC CAA TAT GTT TAT TCC GGT TGG TTT	539
Gln Ala Thr Gly His Glu Asn Phe Gln Tyr Val Tyr Ser Gly Trp Phe	
125 130 135 140	
TAT AAA CAT GCA GCG AGT GAA AAA GAT TTC AGT AAC AAA AAA ATT AAG	587
Tyr Lys His Ala Ala Ser Glu Lys Asp Phe Ser Asn Lys Lys Ile Lys	
145 150 155	
TCA GGC GAC GAT GGT TAT ATC TTC TAT CAC GGT GAA AAA CCT TCC CGA	635
Ser Gly Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Tyr His Gly Glu Lys Pro Ser Arg	

160	165	170	
CAA CTT CCT GCT TCT GGA AAA GTT ATC TAC AAA GGT GTG TGG CAT TTT			683
Gln Leu Pro Ala Ser Gly Lys Val Ile Tyr Lys Gly Val Trp His Phe			
175	180	185	
GTA ACC GAT ACA AAA AAG GGT CAA GAT TTT CGT GAA ATT ATC CAG CCT			731
Val Thr Asp Thr Lys Lys Gly Gln Asp Phe Arg Glu Ile Ile Gln Pro			
190	195	200	
TCA AAA AAA CAA GGC GAC AGG TAT AGC GGA TTT TCT GGT GAT GGC AGC			779
Ser Lys Lys Gln Gly Asp Arg Tyr Ser Gly Phe Ser Gly Asp Gly Ser			
205	210	215	220
GAA GAA TAT TCC AAC AAA AAC GAA TCC ACG CTG AAA GAT GAT CAC GAG			827
Glu Glu Tyr Ser Asn Lys Asn Glu Ser Thr Leu Lys Asp Asp His Glu			
225	230	235	
GGT TAT GGT TTT ACC TCG AAT TTA GAA GTG GAT TTC GGC AAT AAG AAA			875
Gly Tyr Gly Phe Thr Ser Asn Leu Glu Val Asp Phe Gly Asn Lys Lys			
240	245	250	
TTG ACG GGT AAA TTA ATA CGC AAT AAT GCG AGC CTA AAT AAT AAT ACT			923
Leu Thr Gly Lys Leu Ile Arg Asn Asn Ala Ser Leu Asn Asn Asn Thr			
255	260	265	
AAT AAT GAC AAA CAT ACC ACC CAA TAC TAC AGC CTT GAT GCA CAA ATA			971
Asn Asn Asp Lys His Thr Thr Gln Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Gln Ile			
270	275	280	
ACA GGC AAC CGC TTC AAC GGC ACG GCA ACG GCA ACT GAC AAA AAA GAG			1019
Thr Gly Asn Arg Phe Asn Gly Thr Ala Thr Ala Thr Asp Lys Lys Glu			
285	290	295	300
AAT GAA ACC AAA CTA CAT CCC TTT GTT TCC GAC TCG TCT TCT TTG AGC			1067
Asn Glu Thr Lys Leu His Pro Phe Val Ser Asp Ser Ser Ser Leu Ser			
305	310	315	
GGC GGC TTT TTC GGC CCG CAG GGT GAG GAA TTG GGT TTC CGC TTT TTG			1115
Gly Gly Phe Phe Gly Pro Gln Gly Glu Glu Leu Gly Phe Arg Phe Leu			
320	325	330	
AGC GAC GAT CAA AAA GTT GCC GTT GTC GGC AGC GCG AAA ACC AAA GAC			1163
Ser Asp Asp Gln Lys Val Ala Val Val Gly Ser Ala Lys Thr Lys Asp			
335	340	345	
AAA CTG GAA AAT GGC GCG GCG GCT TCA GGC AGC ACA GGT GCG GCA GCA			1211
Lys Leu Glu Asn Gly Ala Ala Ala Ser Gly Ser Thr Gly Ala Ala Ala			
350	355	360	
TCG GGC GGT GCG GCA GGC ACG TCG TCT GAA AAC AGT AAG CTG ACC ACG			1259
Ser Gly Gly Ala Ala Gly Thr Ser Ser Glu Asn Ser Lys Leu Thr Thr			
365	370	375	380
GTT TTG GAT GCG GTT GAA TTG ACA CTA AAC GAC AAG AAA ATC AAA AAT			1307
Val Leu Asp Ala Val Glu Leu Thr Leu Asn Asp Lys Lys Ile Lys Asn			
385	390	395	

CTC	GAC	AAC	TTC	AGC	AAT	GCC	GCC	CAA	CTG	GTT	GTC	GAC	GGC	ATT	ATG	1355
Leu	Asp	Asn	Phe	Ser	Asn	Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Val	Asp	Gly	Ile	Met	
			400					405					410			
ATT	CCG	CTC	CTG	CCC	AAG	GAT	TCC	GAA	AGC	GGG	AAC	ACT	CAG	GCA	GAT	1403
Ile	Pro	Leu	Leu	Pro	Lys	Asp	Ser	Glu	Ser	Gly	Asn	Thr	Gln	Ala	Asp	
			415				420					425				
AAA	GGT	AAA	AAC	GGC	GGA	ACA	GAA	TTT	ACC	CGC	AAA	TTT	GAA	CAC	ACG	1451
Lys	Gly	Lys	Asn	Gly	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Arg	Lys	Phe	Glu	His	Thr	
			430				435					440				
CCG	GAA	AGT	GAT	AAA	AAA	GAC	GCC	CAA	GCA	GGT	ACG	CAG	ACG	AAT	GGG	1499
Pro	Glu	Ser	Asp	Lys	Lys	Asp	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Gln	Thr	Asn	Gly	
445						450					455				460	
GCG	CAA	ACC	GCT	TCA	AAT	ACG	GCA	GGT	GAT	ACC	AAT	GGC	AAA	ACA	AAA	1547
Ala	Gln	Thr	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Gly	Asp	Thr	Asn	Gly	Lys	Thr	Lys	
				465					470					475		
ACC	TAT	GAA	GTC	GAA	GTC	TGC	TGT	TCC	AAC	CTC	AAT	TAT	CTG	AAA	TAC	1595
Thr	Tyr	Glu	Val	Glu	Val	Cys	Cys	Ser	Asn	Leu	Asn	Tyr	Leu	Lys	Tyr	
			480						485				490			
GGA	ATG	TTG	ACG	CGC	AAA	AAC	AGC	AAG	TCC	GCG	ATG	CAG	GCA	GGA	GGA	1643
Gly	Met	Leu	Thr	Arg	Lys	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Met	Gln	Ala	Gly	Gly	
			495				500					505				
AAC	AGT	AGT	CAA	GCT	GAT	GCT	AAA	ACG	GAA	CAA	GTT	GAA	CAA	AGT	ATG	1691
Asn	Ser	Ser	Gln	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Glu	Gln	Val	Glu	Gln	Ser	Met	
			510				515					520				
TTC	CTC	CAA	GGC	GAG	CGT	ACC	GAT	GAA	AAA	GAG	ATT	CCA	ACC	GAC	CAA	1739
Phe	Leu	Gln	Gly	Glu	Arg	Thr	Asp	Glu	Lys	Glu	Ile	Pro	Thr	Asp	Gln	
525						530					535				540	
AAC	GTC	GTT	TAT	CGG	GGG	TCT	TGG	TAC	GGG	CAT	ATT	GCC	AAC	GGC	ACA	1787
Asn	Val	Val	Tyr	Arg	Gly	Ser	Trp	Tyr	Gly	His	Ile	Ala	Asn	Gly	Thr	
				545					550					555		
AGC	TGG	AGC	GGC	AAT	GCT	TCT	GAT	AAA	GAG	GGC	GGC	AAC	AGG	GCG	GAA	1835
Ser	Trp	Ser	Gly	Asn	Ala	Ser	Asp	Lys	Glu	Gly	Gly	Asn	Arg	Ala	Glu	
			560					565					570			
TTT	ACT	GTG	AAT	TTT	GCC	GAT	AAA	AAA	ATT	ACC	GGC	AAG	TTA	ACC	GCT	1883
Phe	Thr	Val	Asn	Phe	Ala	Asp	Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Lys	Leu	Thr	Ala	
			575				580					585				
GAA	AAC	AGG	CAG	GCG	CAA	ACC	TTT	ACC	ATT	GAG	GGA	ATG	ATT	CAG	GGC	1931
Glu	Asn	Arg	Gln	Ala	Gln	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu	Gly	Met	Ile	Gln	Gly	
			590				595				600					
AAC	GGC	TTT	GAA	GGT	ACG	GCG	AAA	ACT	GCT	GAG	TCA	GGT	TTT	GAT	CTC	1979
Asn	Gly	Phe	Glu	Gly	Thr	Ala	Lys	Thr	Ala	Glu	Ser	Gly	Phe	Asp	Leu	
605						610				615					620	
GAT	CAA	AAA	AAT	ACC	ACC	CGC	ACG	CCT	AAG	GCA	TAT	ATC	ACA	GAT	GCC	2027
Asp	Gln	Lys	Asn	Thr	Thr	Arg	Thr	Pro	Lys	Ala	Tyr	Ile	Thr	Asp	Ala	

625	630	635	
AAG GTA AAG GGC GGT TTT TAC GGG CCT AAA GCC GAA GAG TTG GGC GGA			2075
Lys Val Lys Gly Gly Phe Tyr Gly Pro Lys Ala Glu Glu Leu Gly Gly			
640	645	650	
TGG TTT GCC TAT CCG GGC GAT AAA CAA ACG GAA AAG GCA ACA GCT ACA			2123
Trp Phe Ala Tyr Pro Gly Asp Lys Gln Thr Glu Lys Ala Thr Ala Thr			
655	660	665	
TCC AGC GAT GGA AAT TCA GCA AGC AGC GCG ACC GTG GTA TTC GGT GCG			2171
Ser Ser Asp Gly Asn Ser Ala Ser Ser Ala Thr Val Val Phe Gly Ala			
670	675	680	
AAA CGC CAA CAG CCT GTG CAA TAAGCACGGT TGCCGAACAA TCAAGAATAA			2222
Lys Arg Gln Gln Pro Val Gln			
685	690		
GGCTTCAG			2230

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 711 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Asn Asn Pro Leu Val Asn Gln Ala Ala Met Val Leu Pro Val Phe			
-20	-15	-10	-5
Leu Leu Ser Ala Cys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Phe Asp Leu Asp Ser			
1	5	10	
Val Asp Thr Glu Ala Pro Arg Pro Ala Pro Lys Tyr Gln Asp Val Ser			
15	20	25	
Ser Glu Lys Pro Gln Ala Gln Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Gly Phe Ala			
30	35	40	
Met Arg Leu Lys Arg Arg Asn Trp Tyr Pro Gly Ala Glu Glu Ser Glu			
45	50	55	60
Val Lys Leu Asn Glu Ser Asp Trp Glu Ala Thr Gly Leu Pro Thr Lys			
65	70	75	
Pro Lys Glu Leu Pro Lys Arg Gln Lys Ser Val Ile Glu Lys Val Glu			
80	85	90	
Thr Asp Gly Asp Ser Asp Ile Tyr Ser Ser Pro Tyr Leu Thr Pro Ser			
95	100	105	
Asn His Gln Asn Gly Ser Ala Gly Asn Gly Val Asn Gln Pro Lys Asn			
110	115	120	

Gln Ala Thr Gly His Glu Asn Phe Gln Tyr Val Tyr Ser Gly Trp Phe
 125 130 135 140
 Tyr Lys His Ala Ala Ser Glu Lys Asp Phe Ser Asn Lys Lys Ile Lys
 145 150 155
 Ser Gly Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Tyr His Gly Glu Lys Pro Ser Arg
 160 165 170
 Gln Leu Pro Ala Ser Gly Lys Val Ile Tyr Lys Gly Val Trp His Phe
 175 180 185
 Val Thr Asp Thr Lys Lys Gly Gln Asp Phe Arg Glu Ile Ile Gln Pro
 190 195 200
 Ser Lys Lys Gln Gly Asp Arg Tyr Ser Gly Phe Ser Gly Asp Gly Ser
 205 210 215 220
 Glu Glu Tyr Ser Asn Lys Asn Glu Ser Thr Leu Lys Asp Asp His Glu
 225 230 235
 Gly Tyr Gly Phe Thr Ser Asn Leu Glu Val Asp Phe Gly Asn Lys Lys
 240 245 250
 Leu Thr Gly Lys Leu Ile Arg Asn Asn Ala Ser Leu Asn Asn Thr
 255 260 265
 Asn Asn Asp Lys His Thr Thr Gln Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Gln Ile
 270 275 280
 Thr Gly Asn Arg Phe Asn Gly Thr Ala Thr Ala Thr Asp Lys Lys Glu
 285 290 295 300
 Asn Glu Thr Lys Leu His Pro Phe Val Ser Asp Ser Ser Ser Leu Ser
 305 310 315
 Gly Gly Phe Phe Gly Pro Gln Gly Glu Glu Leu Gly Phe Arg Phe Leu
 320 325 330
 Ser Asp Asp Gln Lys Val Ala Val Val Gly Ser Ala Lys Thr Lys Asp
 335 340 345
 Lys Leu Glu Asn Gly Ala Ala Ala Ser Gly Ser Thr Gly Ala Ala Ala
 350 355 360
 Ser Gly Gly Ala Ala Gly Thr Ser Ser Glu Asn Ser Lys Leu Thr Thr
 365 370 375 380
 Val Leu Asp Ala Val Glu Leu Thr Leu Asn Asp Lys Lys Ile Lys Asn
 385 390 395
 Leu Asp Asn Phe Ser Asn Ala Ala Gln Leu Val Val Asp Gly Ile Met
 400 405 410
 Ile Pro Leu Leu Pro Lys Asp Ser Glu Ser Gly Asn Thr Gln Ala Asp
 415 420 425
 Lys Gly Lys Asn Gly Gly Thr Glu Phe Thr Arg Lys Phe Glu His Thr

430	435	440
Pro Glu Ser Asp Lys Lys Asp Ala Gln Ala Gly Thr Gln Thr Asn Gly		
445	450	455 460
Ala Gln Thr Ala Ser Asn Thr Ala Gly Asp Thr Asn Gly Lys Thr Lys		
	465	470 475
Thr Tyr Glu Val Glu Val Cys Cys Ser Asn Leu Asn Tyr Leu Lys Tyr		
	480	485 490
Gly Met Leu Thr Arg Lys Asn Ser Lys Ser Ala Met Gln Ala Gly Gly		
	495	500 505
Asn Ser Ser Gln Ala Asp Ala Lys Thr Glu Gln Val Glu Gln Ser Met		
	510	515 520
Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Lys Glu Ile Pro Thr Asp Gln		
525	530	535 540
Asn Val Val Tyr Arg Gly Ser Trp Tyr Gly His Ile Ala Asn Gly Thr		
	545	550 555
Ser Trp Ser Gly Asn Ala Ser Asp Lys Glu Gly Gly Asn Arg Ala Glu		
	560	565 570
Phe Thr Val Asn Phe Ala Asp Lys Lys Ile Thr Gly Lys Leu Thr Ala		
	575	580 585
Glu Asn Arg Gln Ala Gln Thr Phe Thr Ile Glu Gly Met Ile Gln Gly		
	590	595 600
Asn Gly Phe Glu Gly Thr Ala Lys Thr Ala Glu Ser Gly Phe Asp Leu		
605	610	615 620
Asp Gln Lys Asn Thr Thr Arg Thr Pro Lys Ala Tyr Ile Thr Asp Ala		
	625	630 635
Lys Val Lys Gly Gly Phe Tyr Gly Pro Lys Ala Glu Glu Leu Gly Gly		
	640	645 650
Trp Phe Ala Tyr Pro Gly Asp Lys Gln Thr Glu Lys Ala Thr Ala Thr		
	655	660 665
Ser Ser Asp Gly Asn Ser Ala Ser Ser Ala Thr Val Val Phe Gly Ala		
	670	675 680
Lys Arg Gln Gln Pro Val Gln		
685	690	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1808 paires de bases
- (B) TYPE: nucl,otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: N. meningitidis
- (B) SOUCHE: IM2394

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: sig_peptide
- (B) EMPLACEMENT:1..60

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: mat_peptide
- (B) EMPLACEMENT:61..1797

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT:1..1797

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:61..1035

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:1036..1386

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:1387..1797

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_binding
- (B) EMPLACEMENT:46..1050

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG AAC AAT CCA TTG GTA AAT CAG GCT GCT ATG GTG CTG CCT GTG TTT	48
Met Asn Asn Pro Leu Val Asn Gln Ala Ala Met Val Leu Pro Val Phe	
-20 -15 -10 -5	
TTG TTG AGT GCT TGT CTG GGT GGC GGC GGC AGT TTC GAT TTG GAC AGC	96
Leu Leu Ser Ala Cys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Phe Asp Leu Asp Ser	
1 5 10	
GTG GAA ACC GTG CAA GAT ATG CAC TCC AAA CCT AAG TAT GAG GAT GAA	144
Val Glu Thr Val Gln Asp Met His Ser Lys Pro Lys Tyr Glu Asp Glu	
15 20 25	
AAA AGC CAG CCT GAA AGC CAA CAG GAT GTA TCG GAA AAC AGC GGC GCG	192
Lys Ser Gln Pro Glu Ser Gln Gln Asp Val Ser Glu Asn Ser Gly Ala	
30 35 40	
GCT TAT GGC TTT GCA GTA AAA CTA CCT CGC CGG AAT GCA CAT TTT AAT	240
Ala Tyr Gly Phe Ala Val Lys Leu Pro Arg Arg Asn Ala His Phe Asn	
45 50 55 60	
CCT AAA TAT AAG GAA AAG CAC AAA CCA TTG GGT TCA ATG GAT TGG AAA	288

Pro	Lys	Tyr	Lys	Glu	Lys	His	Lys	Pro	Leu	Gly	Ser	Met	Asp	Trp	Lys	
				65					70						75	
AAA	CTG	CAA	AGA	GGA	GAA	CCA	AAT	AGT	TTT	AGT	GAG	AGG	GAT	GAA	TTG	336
Lys	Leu	Gln	Arg	Gly	Glu	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Glu	Arg	Asp	Glu	Leu	
			80				85					90				
GAA	AAA	AAA	CGG	GGT	AGT	TCT	GAA	CTT	ATT	GAA	TCA	AAA	TGG	GAA	GAT	384
Glu	Lys	Lys	Arg	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Ile	Glu	Ser	Lys	Trp	Glu	Asp	
		95					100					105				
GGG	CAA	AGT	CGT	GTA	GTT	GGT	TAT	ACA	AAT	TTC	ACT	TAT	GTC	CGT	TCG	432
Gly	Gln	Ser	Arg	Val	Val	Gly	Tyr	Thr	Asn	Phe	Thr	Tyr	Val	Arg	Ser	
	110					115					120					
GGA	TAT	GTT	TAC	CTT	AAT	AAA	AAT	AAT	ATT	GAT	ATT	AAG	AAT	AAT	ATA	480
Gly	Tyr	Val	Tyr	Leu	Asn	Lys	Asn	Asn	Ile	Asp	Ile	Lys	Asn	Asn	Ile	
125					130					135					140	
GTT	CTT	TTT	GGA	CCT	GAC	GGA	TAT	CTT	TAC	TAT	AAA	GGG	AAA	GAA	CCT	528
Val	Leu	Phe	Gly	Pro	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Lys	Glu	Pro	
				145					150					155		
TCC	AAG	GAG	CTG	CCA	TCG	GAA	AAG	ATA	ACT	TAT	AAA	GGT	ACT	TGG	GAT	576
Ser	Lys	Glu	Leu	Pro	Ser	Glu	Lys	Ile	Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Trp	Asp	
			160					165					170			
TAT	GTT	ACT	GAT	GCT	ATG	GAA	AAA	CAA	AGG	TTT	GAA	GGA	TTG	GGT	AGT	624
Tyr	Val	Thr	Asp	Ala	Met	Glu	Lys	Gln	Arg	Phe	Glu	Gly	Leu	Gly	Ser	
		175					180					185				
GCA	GCA	GGA	GGA	GAT	AAA	TCG	GGG	GCG	TTG	TCT	GCA	TTA	GAA	GAA	GGG	672
Ala	Ala	Gly	Gly	Asp	Lys	Ser	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Glu	Gly	
	190						195					200				
GTA	TTG	CGT	AAT	CAG	GCA	GAG	GCA	TCA	TCC	GGT	CAT	ACC	GAT	TTT	GGT	720
Val	Leu	Arg	Asn	Gln	Ala	Glu	Ala	Ser	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Phe	Gly	
205					210					215					220	
ATG	ACT	AGT	GAG	TTT	GAG	GTT	GAT	TTT	TCT	GAT	AAA	ACA	ATA	AAG	GGC	768
Met	Thr	Ser	Glu	Phe	Glu	Val	Asp	Phe	Ser	Asp	Lys	Thr	Ile	Lys	Gly	
				225					230					235		
ACA	CTT	TAT	CGT	AAC	AAC	CGT	ATT	ACT	CAA	AAT	AAT	AGT	GAA	AAC	AAA	816
Thr	Leu	Tyr	Arg	Asn	Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Asn	Asn	Ser	Glu	Asn	Lys	
			240					245					250			
CAA	ATA	AAA	ACT	ACG	CGT	TAC	ACC	ATT	CAA	GCA	ACT	CTT	CAC	GGC	AAC	864
Gln	Ile	Lys	Thr	Thr	Arg	Tyr	Thr	Ile	Gln	Ala	Thr	Leu	His	Gly	Asn	
		255					260					265				
CGT	TTC	AAA	GGT	AAG	GCG	TTG	GCG	GCA	GAT	AAA	GGT	GCA	ACA	AAT	GGA	912
Arg	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Asp	Lys	Gly	Ala	Thr	Asn	Gly	
	270					275					280					
AGT	CAT	CCC	TTT	ATT	TCC	GAC	TCC	GAC	AGT	TTG	GAA	GGC	GGA	TTT	TAC	960
Ser	His	Pro	Phe	Ile	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Leu	Glu	Gly	Gly	Phe	Tyr	
285					290					295					300	

GGG CCG AAA GGC GAG GAA CTT GCC GGT AAA TTC TTG AGC AAC GAC AAC Gly Pro Lys Gly Glu Glu Leu Ala Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Asn 305 310 315	1008
AAA GTT GCA GCG GTG TTT GGT GCG AAG CAG AAA GAT AAG AAG GAT GGG Lys Val Ala Ala Val Phe Gly Ala Lys Gln Lys Asp Lys Lys Asp Gly 320 325 330	1056
GAA AAC GCG GCA GGG CCT GCA ACG GAA ACC GTG ATA GAT GCA TAC CGT Glu Asn Ala Ala Gly Pro Ala Thr Glu Thr Val Ile Asp Ala Tyr Arg 335 340 345	1104
ATT ACC GGC GAG GAG TTT AAG AAA GAG CAA ATA GAC AGT TTT GGA GAT Ile Thr Gly Glu Glu Phe Lys Lys Glu Gln Ile Asp Ser Phe Gly Asp 350 355 360	1152
GTG AAA AAG CTG CTG GTT GAC GGA GTG GAG CTT TCA CTG CTG CCG TCT Val Lys Lys Leu Leu Val Asp Gly Val Glu Leu Ser Leu Leu Pro Ser 365 370 375 380	1200
GAG GGC AAT AAG GCG GCA TTT CAG CAC GAG ATT GAG CAA AAC GGC GTG Glu Gly Asn Lys Ala Ala Phe Gln His Glu Ile Glu Gln Asn Gly Val 385 390 395	1248
AAG GCA ACG GTG TGT TGT TCC AAC TTG GAT TAC ATG AGT TTT GGG AAG Lys Ala Thr Val Cys Cys Ser Asn Leu Asp Tyr Met Ser Phe Gly Lys 400 405 410	1296
CTG TCA AAA GAA AAT AAA GAC GAT ATG TTC CTG CAA GGT GTC CGC ACT Leu Ser Lys Glu Asn Lys Asp Asp Met Phe Leu Gln Gly Val Arg Thr 415 420 425	1344
CCA GTA TCC GAT GTG GCG GCA AGG ACG GAG GCA AAC GCC AAA TAT CGC Pro Val Ser Asp Val Ala Arg Thr Glu Ala Asn Ala Lys Tyr Arg 430 435 440	1392
GGT ACT TGG TAC GGA TAT ATT GCC AAC GGC ACA AGC TGG AGC GGC GAA Gly Thr Trp Tyr Gly Tyr Ile Ala Asn Gly Thr Ser Trp Ser Gly Glu 445 450 455 460	1440
GCC TCC AAT CAG GAA GGT GGT AAT AGG GCA GAG TTT GAC GTG GAT TTT Ala Ser Asn Gln Glu Gly Gly Asn Arg Ala Glu Phe Asp Val Asp Phe 465 470 475	1488
TCC ACT AAA AAA ATC AGT GGC ACA CTG ACG GCA AAA GAC CGT ACG TCT Ser Thr Lys Lys Ile Ser Gly Thr Leu Thr Ala Lys Asp Arg Thr Ser 480 485 490	1536
CCT GCG TTT ACT ATT ACT GCC ATG ATT AAG GAC AAC GGT TTT TCA GGT Pro Ala Phe Thr Ile Thr Ala Met Ile Lys Asp Asn Gly Phe Ser Gly 495 500 505	1584
GTG GCG AAA ACC GGT GAA AAC GGC TTT GCG CTG GAT CCG CAA AAT ACC Val Ala Lys Thr Gly Glu Asn Gly Phe Ala Leu Asp Pro Gln Asn Thr 510 515 520	1632
GGA AAT TCC CAC TAT ACG CAT ATT GAA GCC ACT GTA TCC GGC GGT TTC	1680

Gly Asn Ser His Tyr Thr His Ile Glu Ala Thr Val Ser Gly Gly Phe
 525 530 535 540

TAC GGC AAA AAC GCC ATC GAG ATG GGC GGA TCG TTC TCA TTT CCG GGA 1728
 Tyr Gly Lys Asn Ala Ile Glu Met Gly Gly Ser Phe Ser Phe Pro Gly
 545 550 555

AAT GCA CCA GAG GGA AAA CAA GAA AAA GCA TCG GTG GTA TTC GGT GCG 1776
 Asn Ala Pro Glu Gly Lys Gln Glu Lys Ala Ser Val Val Phe Gly Ala
 560 565 570

AAA CGC CAA CAG CTT GTG CAA TAAGCACGGC T 1808
 Lys Arg Gln Gln Leu Val Gln
 575

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 599 acides amin,s
 (B) TYPE: acide amin,
 (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Met Asn Asn Pro Leu Val Asn Gln Ala Ala Met Val Leu Pro Val Phe
 -20 -15 -10 -5

Leu Leu Ser Ala Cys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Phe Asp Leu Asp Ser
 1 5 10

Val Glu Thr Val Gln Asp Met His Ser Lys Pro Lys Tyr Glu Asp Glu
 15 20 25

Lys Ser Gln Pro Glu Ser Gln Gln Asp Val Ser Glu Asn Ser Gly Ala
 30 35 40

Ala Tyr Gly Phe Ala Val Lys Leu Pro Arg Arg Asn Ala His Phe Asn
 45 50 55 60

Pro Lys Tyr Lys Glu Lys His Lys Pro Leu Gly Ser Met Asp Trp Lys
 65 70 75

Lys Leu Gln Arg Gly Glu Pro Asn Ser Phe Ser Glu Arg Asp Glu Leu
 80 85 90

Glu Lys Lys Arg Gly Ser Ser Glu Leu Ile Glu Ser Lys Trp Glu Asp
 95 100 105

Gly Gln Ser Arg Val Val Gly Tyr Thr Asn Phe Thr Tyr Val Arg Ser
 110 115 120

Gly Tyr Val Tyr Leu Asn Lys Asn Asn Ile Asp Ile Lys Asn Asn Ile
 125 130 135 140

Val Leu Phe Gly Pro Asp Gly Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Lys Glu Pro
 145 150 155

Ser Lys Glu Leu Pro Ser Glu Lys Ile Thr Tyr Lys Gly Thr Trp Asp
 160 165 170
 Tyr Val Thr Asp Ala Met Glu Lys Gln Arg Phe Glu Gly Leu Gly Ser
 175 180 185
 Ala Ala Gly Gly Asp Lys Ser Gly Ala Leu Ser Ala Leu Glu Glu Gly
 190 195 200
 Val Leu Arg Asn Gln Ala Glu Ala Ser Ser Gly His Thr Asp Phe Gly
 205 210 215 220
 Met Thr Ser Glu Phe Glu Val Asp Phe Ser Asp Lys Thr Ile Lys Gly
 225 230 235
 Thr Leu Tyr Arg Asn Asn Arg Ile Thr Gln Asn Asn Ser Glu Asn Lys
 240 245 250
 Gln Ile Lys Thr Thr Arg Tyr Thr Ile Gln Ala Thr Leu His Gly Asn
 255 260 265
 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Leu Ala Ala Asp Lys Gly Ala Thr Asn Gly
 270 275 280
 Ser His Pro Phe Ile Ser Asp Ser Asp Ser Leu Glu Gly Gly Phe Tyr
 285 290 295 300
 Gly Pro Lys Gly Glu Glu Leu Ala Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Asn
 305 310 315
 Lys Val Ala Ala Val Phe Gly Ala Lys Gln Lys Asp Lys Lys Asp Gly
 320 325 330
 Glu Asn Ala Ala Gly Pro Ala Thr Glu Thr Val Ile Asp Ala Tyr Arg
 335 340 345
 Ile Thr Gly Glu Glu Phe Lys Lys Glu Gln Ile Asp Ser Phe Gly Asp
 350 355 360
 Val Lys Lys Leu Leu Val Asp Gly Val Glu Leu Ser Leu Leu Pro Ser
 365 370 375 380
 Glu Gly Asn Lys Ala Ala Phe Gln His Glu Ile Glu Gln Asn Gly Val
 385 390 395
 Lys Ala Thr Val Cys Cys Ser Asn Leu Asp Tyr Met Ser Phe Gly Lys
 400 405 410
 Leu Ser Lys Glu Asn Lys Asp Asp Met Phe Leu Gln Gly Val Arg Thr
 415 420 425
 Pro Val Ser Asp Val Ala Ala Arg Thr Glu Ala Asn Ala Lys Tyr Arg
 430 435 440
 Gly Thr Trp Tyr Gly Tyr Ile Ala Asn Gly Thr Ser Trp Ser Gly Glu
 445 450 455 460

- 55 -

Ala Ser Asn Gln Glu Gly Gly Asn Arg Ala Glu Phe Asp Val Asp Phe
 465 470 475

Ser Thr Lys Lys Ile Ser Gly Thr Leu Thr Ala Lys Asp Arg Thr Ser
 480 485 490

Pro Ala Phe Thr Ile Thr Ala Met Ile Lys Asp Asn Gly Phe Ser Gly
 495 500 505

Val Ala Lys Thr Gly Glu Asn Gly Phe Ala Leu Asp Pro Gln Asn Thr
 510 515 520

Gly Asn Ser His Tyr Thr His Ile Glu Ala Thr Val Ser Gly Gly Phe
 525 530 535 540

Tyr Gly Lys Asn Ala Ile Glu Met Gly Gly Ser Phe Ser Phe Pro Gly
 545 550 555

Asn Ala Pro Glu Gly Lys Gln Glu Lys Ala Ser Val Val Phe Gly Ala
 560 565 570

Lys Arg Gln Gln Leu Val Gln
 575

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2064 paires de bases
- (B) TYPE: nucl,otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Neisseria meningitidis
- (B) SOUCHE: 8680

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT:1..2061

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: sig_peptide
- (B) EMPLACEMENT:1..30

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: mat_peptide
- (B) EMPLACEMENT:31..2061

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

ATG GTG CTG CCT GTG TTT TTG TCG AGT GCT TGT CTG GGC GGA GGC GGC	48
Met Val Leu Pro Val Phe Leu Ser Ser Ala Cys Leu Gly Gly Gly Gly	
-10 -5 1 5	
GGC AGT TTC GAT CTT GAT TCT GTC GAT ACC GAA GCC CCG CGT CCC GCG	96

Gly	Ser	Phe	Asp	Leu	Asp	Ser	Val	Asp	Thr	Glu	Ala	Pro	Arg	Pro	Ala	
			10					15					20			
CCA	AAG	TAT	CAA	GAT	GTT	TCT	TCC	GAA	AAG	CCG	AAA	GCC	CAA	AAA	GAC	144
Pro	Lys	Tyr	Gln	Asp	Val	Ser	Ser	Glu	Lys	Pro	Lys	Ala	Gln	Lys	Asp	
		25					30				35					
CAA	GGC	GGA	TAC	GGT	TTT	GCA	ATG	CGC	TTT	AAG	CGG	AGG	AAT	TGG	TAT	192
Gln	Gly	Gly	Tyr	Gly	Phe	Ala	Met	Arg	Phe	Lys	Arg	Arg	Asn	Trp	Tyr	
	40					45					50					
CAG	AAG	GCG	AAT	CCT	AAA	GAA	GAT	GAG	ATA	AAA	CTC	TCT	GAA	AAT	GAT	240
Gln	Lys	Ala	Asn	Pro	Lys	Glu	Asp	Glu	Ile	Lys	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	
55					60					65					70	
TGG	GAA	CAA	ACG	GAT	AAT	GGT	GAT	ATC	AAA	AAC	CCT	TCC	AAA	CAA	AAA	288
Trp	Glu	Gln	Thr	Asp	Asn	Gly	Asp	Ile	Lys	Asn	Pro	Ser	Lys	Gln	Lys	
				75					80					85		
AAT	ATT	ATT	AAT	GCC	TTA	CCT	GGA	AAT	AAT	GGA	GGA	GCT	ACA	TTG	CAA	336
Asn	Ile	Ile	Asn	Ala	Leu	Pro	Gly	Asn	Asn	Gly	Gly	Ala	Thr	Leu	Gln	
			90					95					100			
GAT	TCC	AGT	CAA	GAA	AAT	CAG	GGT	ATA	TCT	AAG	GTT	ACG	GAC	TAT	CAC	384
Asp	Ser	Ser	Gln	Glu	Asn	Gln	Gly	Ile	Ser	Lys	Val	Thr	Asp	Tyr	His	
		105					110					115				
AAT	TTC	CAA	TAC	GTA	TGG	TCG	GGG	TTT	TTT	TAT	AAA	CAG	ATT	AAA	AAT	432
Asn	Phe	Gln	Tyr	Val	Trp	Ser	Gly	Phe	Phe	Tyr	Lys	Gln	Ile	Lys	Asn	
	120						125				130					
ACA	ATT	GAA	AAA	AAC	GGT	TCA	TCT	ATA	ACC	GCA	GCC	AGA	AAC	GGT	CCT	480
Thr	Ile	Glu	Lys	Asn	Gly	Ser	Ser	Ile	Thr	Ala	Ala	Arg	Asn	Gly	Pro	
135					140					145					150	
GAC	GGT	TAT	ATT	TTT	TAT	AAA	GGC	AAA	GAT	CCC	TCG	AGA	CAA	CTC	CCT	528
Asp	Gly	Tyr	Ile	Phe	Tyr	Lys	Gly	Lys	Asp	Pro	Ser	Arg	Gln	Leu	Pro	
				155					160					165		
GTA	TTG	GGA	CAG	GTT	ACG	TAT	AAA	GGG	ACT	TGG	GAT	TTC	TTA	ACT	GAT	576
Val	Leu	Gly	Gln	Val	Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Trp	Asp	Phe	Leu	Thr	Asp	
			170					175					180			
GTG	AAA	ATA	AAT	CAG	AAA	TTT	ATA	GAT	TTA	GGG	AAT	ACT	TCT	ACG	AAA	624
Val	Lys	Ile	Asn	Gln	Lys	Phe	Ile	Asp	Leu	Gly	Asn	Thr	Ser	Thr	Lys	
		185					190					195				
CCC	GGC	GAC	CGA	TAT	AGT	GCT	TTT	TCC	GGG	GAG	TTG	GAT	TAT	ATC	GTC	672
Pro	Gly	Asp	Arg	Tyr	Ser	Ala	Phe	Ser	Gly	Glu	Leu	Asp	Tyr	Ile	Val	
	200					205					210					
AAT	AAA	GAT	AGC	GAT	AAG	AAA	GAC	GGG	CAC	GTA	GCA	AAG	GGA	TTA	ACA	720
Asn	Lys	Asp	Ser	Asp	Lys	Lys	Asp	Gly	His	Val	Ala	Lys	Gly	Leu	Thr	
215					220					225				230		
ACG	GAA	ATA	ACG	GTT	GAT	TTT	GAG	AAA	AAA	ACC	CTC	AAC	GGA	AAA	TTA	768
Thr	Glu	Ile	Thr	Val	Asp	Phe	Glu	Lys	Lys	Thr	Leu	Asn	Gly	Lys	Leu	
				235					240					245		

ATT AAA AAC AAC AGT GTA AGC AAT AAT GAG TTC AAC GCT AAA TAC ACC	816
Ile Lys Asn Asn Ser Val Ser Asn Asn Glu Phe Asn Ala Lys Tyr Thr	
250 255 260	
ACC CAA TAC TAT AGC CTT GAT GCG ACG CTT AGG GGA AAC CGC TTC AAC	864
Thr Gln Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Thr Leu Arg Gly Asn Arg Phe Asn	
265 270 275	
GGC AAG GCA ACG GCA ACC GAC AAA CCT GGC ACT GGA GAA ACC AAA CAA	912
Gly Lys Ala Thr Ala Thr Asp Lys Pro Gly Thr Gly Glu Thr Lys Gln	
280 285 290	
CAT CCC TTT GTT TCC GAC TCG TCT TCT TTG AGC GGC GGC TTT TTC GGC	960
His Pro Phe Val Ser Asp Ser Ser Ser Leu Ser Gly Gly Phe Phe Gly	
295 300 305 310	
CCG AAG GGT GAG GAA TTG GGT TTC CGC TTT TTG AGC GAC GAT AAA AAA	1008
Pro Lys Gly Glu Glu Leu Gly Phe Arg Phe Leu Ser Asp Asp Lys Lys	
315 320 325	
GTT GCG GTT GTC GGC AGC GCG AAA ACC CAA GAC AAA CCG GGA AAT GGC	1056
Val Ala Val Val Gly Ser Ala Lys Thr Gln Asp Lys Pro Gly Asn Gly	
330 335 340	
GCG GCG GCT TCA GAC GGC GAG GTG CGG CAG CAT CAA ACG GTG CGG CAG	1104
Ala Ala Ala Ser Asp Gly Glu Val Arg Gln His Gln Thr Val Arg Gln	
345 350 355	
CTA GAT GGC TCT GAA AAC GGT AAG CTG ACC ACG GTT TTG GAT GCG GTC	1152
Leu Asp Gly Ser Glu Asn Gly Lys Leu Thr Thr Val Leu Asp Ala Val	
360 365 370	
GAG CTG ACG CAC GGC GGC ACA GCA ATC AAA AAT CTC GAC AAC TTC AGC	1200
Glu Leu Thr His Gly Gly Thr Ala Ile Lys Asn Leu Asp Asn Phe Ser	
375 380 385 390	
AAC GCC GCC CAA CTG GTT GTC GAC GGC ATT ATG ATT CCG CTC CCT GCC	1248
Asn Ala Ala Gln Leu Val Val Asp Gly Ile Met Ile Pro Leu Pro Ala	
395 400 405	
GAG GCT TCC GAA AGT GGG AAC AAT CAA GCC AAT CAA GGT ACA AAT GGC	1296
Glu Ala Ser Glu Ser Gly Asn Asn Gln Ala Asn Gln Gly Thr Asn Gly	
410 415 420	
GGA ACA GCC TTT ACC CGC AAA TTT GAC CAC ACG CCG AAA AGC GAT GAA	1344
Gly Thr Ala Phe Thr Arg Lys Phe Asp His Thr Pro Lys Ser Asp Glu	
425 430 435	
AAA GAC ACC CAA GCA GGT ACG GCG GCG AAT GGC AAT CCA GCC GCT TCA	1392
Lys Asp Thr Gln Ala Gly Thr Ala Ala Asn Gly Asn Pro Ala Ala Ser	
440 445 450	
AAT ACG GCA GGT GAT ACC AAT GGC AAA ACA AAA ACC TAT GAA GTC GAA	1440
Asn Thr Ala Gly Asp Thr Asn Gly Lys Thr Lys Thr Tyr Glu Val Glu	
455 460 465 470	
GTC TGC TGT TCC AAC CTC AAT TAT CTG AAA TAC GGG TTG CTG ACG CGC	1488

Val	Cys	Cys	Ser	Asn	Leu	Asn	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Leu	Thr	Arg	
				475					480					485		
AAA	ACT	GCC	GGT	AAC	ACG	GTG	GGA	AGC	GGC	AAC	GGC	AGC	CCA	ACC	GCC	1536
Lys	Thr	Ala	Gly	Asn	Thr	Val	Gly	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Pro	Thr	Ala	
			490					495					500			
GCC	GCC	CAA	ACG	GAC	GCG	CAG	AGT	ATG	TTC	TTA	CAA	GGC	GAG	CGC	ACC	1584
Ala	Ala	Gln	Thr	Asp	Ala	Gln	Ser	Met	Phe	Leu	Gln	Gly	Glu	Arg	Thr	
			505				510					515				
GAT	GAA	AAA	GAG	ATT	CCA	AGC	GAG	CAA	AAC	GTC	GTT	TAT	CGG	GGG	TCT	1632
Asp	Glu	Lys	Glu	Ile	Pro	Ser	Glu	Gln	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Ser		
	520					525					530					
TGG	TAC	GGG	CAT	ATT	GCC	AAC	AGC	ACA	AGC	TGG	AGC	GGC	AAT	GCT	TCC	1680
Trp	Tyr	Gly	His	Ile	Ala	Asn	Ser	Thr	Ser	Trp	Ser	Gly	Asn	Ala	Ser	
	535				540					545				550		
AAT	GCA	ACG	AGT	GGC	AAC	AAG	GCG	GAC	TTT	ACC	GTG	AAT	TTT	GGC	GAG	1728
Asn	Ala	Thr	Ser	Gly	Asn	Lys	Ala	Asp	Phe	Thr	Val	Asn	Phe	Gly	Glu	
				555				560						565		
AAA	AAA	ATT	ACC	GGC	ATG	TTA	ACC	GCT	GAA	AAC	AGG	CAG	GCG	GCA	ACC	1776
Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Met	Leu	Thr	Ala	Glu	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Thr	
			570					575					580			
TTT	ACC	ATT	GAG	GGA	ACG	ATT	CAG	GGC	AAC	GGT	TTT	TCC	GGT	ACG	GCA	1824
Phe	Thr	Ile	Glu	Gly	Thr	Ile	Gln	Gly	Asn	Gly	Phe	Ser	Gly	Thr	Ala	
			585				590					595				
AAA	ACT	GCT	GAC	TCA	GGC	TTT	GAT	CTC	GAT	CAA	AGC	AAT	ACC	ACC	GGC	1872
Lys	Thr	Ala	Asp	Ser	Gly	Phe	Asp	Leu	Asp	Gln	Ser	Asn	Thr	Thr	Gly	
	600					605					610					
ACG	CCT	AAG	GCA	TAT	ATC	ACA	AAC	GCC	AAG	GTG	CAG	GGC	GGT	TTT	TAC	1920
Thr	Pro	Lys	Ala	Tyr	Ile	Thr	Asn	Ala	Lys	Val	Gln	Gly	Gly	Phe	Tyr	
	615				620					625				630		
GGG	CCT	AAA	GCC	GAA	GAA	ATG	GGT	GGA	TGG	TTT	GCT	TAT	CCG	GGC	GAC	1968
Gly	Pro	Lys	Ala	Glu	Glu	Met	Gly	Gly	Trp	Phe	Ala	Tyr	Pro	Gly	Asp	
			635					640				645				
AGT	CAG	ACG	CAG	CGG	TCC	GCT	TCG	GGG	TCA	GGC	GCA	TCA	GCC	GCC	AAC	2016
Ser	Gln	Thr	Gln	Arg	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Asn	
			650					655				660				
AGC	GCG	ACC	GTG	GTA	TTC	GGT	GCG	AAA	CGC	CAA	CAG	CTT	GTG	CAA		2061
Ser	Ala	Thr	Val	Val	Phe	Gly	Ala	Lys	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Gln		
			665				670				675					
TAA																2064

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 687 acides amin,s

(B) TYPE: acide amin,
 (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

```

Met Val Leu Pro Val Phe Leu Ser Ser Ala Cys Leu Gly Gly Gly Gly
-10          -5          1          5

Gly Ser Phe Asp Leu Asp Ser Val Asp Thr Glu Ala Pro Arg Pro Ala
          10          15          20

Pro Lys Tyr Gln Asp Val Ser Ser Glu Lys Pro Lys Ala Gln Lys Asp
          25          30          35

Gln Gly Gly Tyr Gly Phe Ala Met Arg Phe Lys Arg Arg Asn Trp Tyr
          40          45          50

Gln Lys Ala Asn Pro Lys Glu Asp Glu Ile Lys Leu Ser Glu Asn Asp
          55          60          65          70

Trp Glu Gln Thr Asp Asn Gly Asp Ile Lys Asn Pro Ser Lys Gln Lys
          75          80          85

Asn Ile Ile Asn Ala Leu Pro Gly Asn Asn Gly Gly Ala Thr Leu Gln
          90          95          100

Asp Ser Ser Gln Glu Asn Gln Gly Ile Ser Lys Val Thr Asp Tyr His
          105          110          115

Asn Phe Gln Tyr Val Trp Ser Gly Phe Phe Tyr Lys Gln Ile Lys Asn
          120          125          130

Thr Ile Glu Lys Asn Gly Ser Ser Ile Thr Ala Ala Arg Asn Gly Pro
          135          140          145          150

Asp Gly Tyr Ile Phe Tyr Lys Gly Lys Asp Pro Ser Arg Gln Leu Pro
          155          160          165

Val Leu Gly Gln Val Thr Tyr Lys Gly Thr Trp Asp Phe Leu Thr Asp
          170          175          180

Val Lys Ile Asn Gln Lys Phe Ile Asp Leu Gly Asn Thr Ser Thr Lys
          185          190          195

Pro Gly Asp Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Gly Glu Leu Asp Tyr Ile Val
          200          205          210

Asn Lys Asp Ser Asp Lys Lys Asp Gly His Val Ala Lys Gly Leu Thr
          215          220          225          230

Thr Glu Ile Thr Val Asp Phe Glu Lys Lys Thr Leu Asn Gly Lys Leu
          235          240          245

Ile Lys Asn Asn Ser Val Ser Asn Asn Glu Phe Asn Ala Lys Tyr Thr
          250          255          260

Thr Gln Tyr Tyr Ser Leu Asp Ala Thr Leu Arg Gly Asn Arg Phe Asn

```

265	270	275
Gly Lys Ala Thr Ala Thr 280	Asp Lys Pro Gly Thr 285	Gly Glu Thr Lys Gln 290
His Pro Phe Val Ser 295	Asp Ser Ser Ser Leu 300	Ser Gly Gly Phe Phe Gly 305 310
Pro Lys Gly Glu Glu Leu 315	Gly Phe Arg Phe Leu 320	Ser Asp Asp Lys Lys 325
Val Ala Val Val Gly Ser 330	Ala Lys Thr Gln Asp 335	Lys Pro Gly Asn Gly 340
Ala Ala Ala Ser Asp Gly 345	Glu Val Arg Gln His 350	Gln Thr Val Arg Gln 355
Leu Asp Gly Ser Glu Asn 360	Gly Lys Leu Thr Thr 365	Val Leu Asp Ala Val 370
Glu Leu Thr His Gly Gly 375	Thr Ala Ile Lys Asn 380 385	Leu Asp Asn Phe Ser 390
Asn Ala Ala Gln Leu Val 395	Val Asp Gly Ile Met 400	Ile Pro Leu Pro Ala 405
Glu Ala Ser Glu Ser Gly 410	Asn Asn Gln Ala Asn 415	Gln Gly Thr Asn Gly 420
Gly Thr Ala Phe Thr Arg 425	Lys Phe Asp His Thr 430	Pro Lys Ser Asp Glu 435
Lys Asp Thr Gln Ala Gly 440	Thr Ala Ala Asn Gly 445	Asn Pro Ala Ala Ser 450
Asn Thr Ala Gly Asp Thr 455	Asn Gly Lys Thr Lys 460 465	Thr Tyr Glu Val Glu 470
Val Cys Cys Ser Asn Leu 475	Asn Tyr Leu Lys Tyr 480	Gly Leu Leu Thr Arg 485
Lys Thr Ala Gly Asn Thr 490	Val Gly Ser Gly Asn 495	Gly Ser Pro Thr Ala 500
Ala Ala Gln Thr Asp Ala 505	Gln Ser Met Phe Leu 510	Gln Gly Glu Arg Thr 515
Asp Glu Lys Glu Ile Pro 520	Ser Glu Gln Asn Val 525	Val Tyr Arg Gly Ser 530
Trp Tyr Gly His Ile Ala 535	Asn Ser Thr Ser Trp 540 545	Ser Gly Asn Ala Ser 550
Asn Ala Thr Ser Gly Asn 555	Lys Ala Asp Phe Thr 560	Val Asn Phe Gly Glu 565
Lys Lys Ile Thr Gly Met 570	Leu Thr Ala Glu Asn 575	Arg Gln Ala Ala Thr 580

Phe Thr Ile Glu Gly Thr Ile Gln Gly Asn Gly Phe Ser Gly Thr Ala
 585 590 595
 Lys Thr Ala Asp Ser Gly Phe Asp Leu Asp Gln Ser Asn Thr Thr Gly
 600 605 610
 Thr Pro Lys Ala Tyr Ile Thr Asn Ala Lys Val Gln Gly Gly Phe Tyr
 615 620 625 630
 Gly Pro Lys Ala Glu Glu Met Gly Gly Trp Phe Ala Tyr Pro Gly Asp
 635 640 645
 Ser Gln Thr Gln Arg Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ala Asn
 650 655 660
 Ser Ala Thr Val Val Phe Gly Ala Lys Arg Gln Gln Leu Val Gln
 665 670 675

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 198 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: N. meningitidis
- (B) SOUCHE: IM2169

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Thr Lys Asp Lys Leu Glu Asn Gly Ala Ala Ala Ser Gly Ser Thr Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Ser Gly Gly Ala Ala Gly Thr Ser Ser Glu Asn Ser Lys
 20 25 30
 Leu Thr Thr Val Leu Asp Ala Val Glu Leu Thr Leu Asn Asp Lys Lys
 35 40 45
 Ile Lys Asn Leu Asp Asn Phe Ser Asn Ala Ala Gln Leu Val Val Asp
 50 55 60
 Gly Ile Met Ile Pro Leu Leu Pro Lys Asp Ser Glu Ser Gly Asn Thr
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Lys Gly Lys Asn Gly Gly Thr Glu Phe Thr Arg Lys Phe
 85 90 95
 Glu His Thr Pro Glu Ser Asp Lys Lys Asp Ala Gln Ala Gly Thr Gln
 100 105 110
 Thr Asn Gly Ala Gln Thr Ala Ser Asn Thr Ala Gly Asp Thr Asn Gly

115		120		125
Lys Thr Lys Thr Tyr Glu Val Glu Val Cys Cys Ser Asn Leu Asn Tyr				
130		135		140
Leu Lys Tyr Gly Met Leu Thr Arg Lys Asn Ser Lys Ser Ala Met Gln				
145		150		155
Ala Gly Gly Asn Ser Ser Gln Ala Asp Ala Lys Thr Glu Gln Val Glu				
	165		170	175
Gln Ser Met Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Lys Glu Ile Pro				
	180		185	190
Thr Asp Gln Asn Val Val				
195				

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 198 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: N. meningitidis
- (B) SOUCHE: 6940

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Thr Lys Asp Lys Thr Glu Asn Gly Ala Val Ala Ser Gly Gly Thr Asp		
1	5	10
Ala Ala Ala Ser Asn Gly Ala Ala Gly Thr Ser Ser Glu Asn Ser Lys		
	20	25
Leu Thr Thr Val Leu Asp Ala Val Glu Leu Lys Leu Gly Asp Lys Glu		
	35	40
Val Gln Lys Leu Asp Asn Phe Ser Asn Ala Ala Gln Leu Val Val Asp		
	50	55
Gly Ile Met Ile Pro Leu Leu Pro Glu Ala Ser Glu Ser Gly Asn Asn		
65	70	75
Gln Ala Asn Gln Gly Thr Asn Gly Gly Thr Ala Phe Thr Arg Lys Phe		
	85	90
Asp His Thr Pro Glu Ser Asp Lys Lys Asp Ala Gln Ala Gly Thr Gln		
	100	105
Thr Asn Gly Ala Gln Thr Ala Ser Asn Thr Ala Gly Asp Thr Asn Gly		
	115	120
		125

Lys Thr Lys Thr Tyr Glu Val Glu Val Cys Cys Ser Asn Leu Asn Tyr
 130 135 140
 Leu Lys Tyr Gly Met Leu Thr Arg Lys Asn Ser Lys Ser Ala Met Gln
 145 150 155 160
 Ala Gly Glu Ser Ser Ser Gln Ala Asp Ala Lys Thr Glu Gln Val Glu
 165 170 175
 Gln Ser Met Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Lys Glu Ile Pro
 180 185 190
 Ser Glu Gln Asn Ile Val
 195

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 198 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: N. meningitidis
- (B) SOUCHE: 2223

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Thr Lys Asp Lys Thr Glu Asn Gly Ala Val Ala Ser Gly Gly Thr Asp
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Ser Asn Gly Ala Ala Gly Thr Ser Ser Glu Asn Ser Lys
 20 25 30
 Leu Thr Thr Val Leu Asp Ala Val Glu Leu Lys Leu Gly Asp Lys Glu
 35 40 45
 Val Gln Lys Leu Asp Asn Phe Ser Asn Ala Ala Gln Leu Val Val Asp
 50 55 60
 Gly Ile Met Ile Pro Leu Leu Pro Glu Ala Ser Glu Ser Gly Asn Asn
 65 70 75 80
 Gln Ala Asn Gln Gly Thr Asn Gly Gly Thr Ala Phe Thr Arg Lys Phe
 85 90 95
 Asp His Thr Pro Glu Ser Asp Lys Lys Asp Ala Gln Ala Gly Thr Gln
 100 105 110
 Ala Asn Gly Ala Gln Thr Ala Ser Asn Thr Ala Gly Asp Thr Asn Gly
 115 120 125
 Lys Thr Lys Thr Tyr Glu Val Glu Val Cys Cys Ser Asn Leu Asn Tyr
 130 135 140

Leu Lys Tyr Gly Met Leu Thr Arg Lys Asn Ser Lys Ser Ala Met Gln
 145 150 155 160
 Ala Gly Glu Ser Ser Ser Gln Ala Asp Ala Lys Thr Glu Gln Val Gly
 165 170 175
 Gln Ser Met Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Lys Glu Ile Pro
 180 185 190
 Ser Glu Gln Asn Ile Val
 195

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 198 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: N. meningitidis
- (B) SOUCHE: C708

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Thr Gln Asp Lys Pro Arg Asn Gly Ala Val Ala Ser Gly Gly Thr Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Arg Ser Asn Gly Ala Ala Gly Gln Ser Ser Glu Asn Ser Lys
 20 25 30
 Leu Thr Thr Val Leu Asp Ala Val Glu Leu Thr Leu Asn Asp Lys Lys
 35 40 45
 Ile Lys Asn Leu Asp Asn Phe Ser Asn Ala Ala Gln Leu Val Val Asp
 50 55 60
 Gly Ile Met Ile Pro Leu Leu Pro Glu Ala Ser Glu Ser Gly Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Ala Asn Gln Gly Thr Asn Gly Gly Thr Ala Phe Thr Arg Lys Phe
 85 90 95
 Asn His Thr Pro Lys Ser Asp Glu Lys Asp Thr Gln Ala Gly Thr Ala
 100 105 110
 Glu Asn Gly Asn Pro Ala Ala Ser Asn Thr Ala Gly Asp Ala Asn Gly
 115 120 125
 Lys Thr Lys Thr Tyr Glu Val Glu Val Cys Cys Ser Asn Leu Asn Tyr
 130 135 140
 Leu Lys Tyr Gly Met Leu Thr Arg Lys Asn Ser Lys Ser Ala Met Gln

145		150		155		160
Ala Gly Glu Ser Ser Ser Gln Ala Asp Ala Lys Thr Glu Gln Val Gly						
	165		170		175	
Gln Ser Met Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Lys Glu Ile Pro						
	180		185		190	
Asn Asp Gln Asn Val Val						
195						

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 211 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: N. meningitidis
- (B) SOUCHE: M978

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Thr Gln Asp Lys Ala Ala Asn Gly Asn Thr Ala Ala Ala Ser Gly Gly																			
1				5				10						15					
Thr Asp Ala Ala Ala Ser Asn Gly Ala Ala Gly Thr Ser Ser Glu Asn																			
			20				25							30					
Ser Lys Leu Thr Thr Val Leu Asp Ala Val Glu Leu Thr Leu Asn Asp																			
		35				40						45							
Lys Lys Ile Lys Asn Leu Asp Asn Phe Ser Asn Ala Ala Gln Leu Val																			
	50					55						60							
Val Asp Gly Ile Met Ile Pro Leu Leu Pro Glu Thr Ser Glu Ser Gly																			
65					70				75					80					
Ser Asn Gln Ala Asp Lys Gly Lys Lys Gly Lys Asn Gly Lys Asn Gly																			
			85					90						95					
Gly Thr Asp Phe Thr Tyr Lys Thr Thr Tyr Thr Pro Lys Asn Asp Asp																			
			100					105						110					
Lys Asp Thr Lys Ala Gln Thr Gly Ala Ala Gly Ser Ser Gly Ala Gln																			
	115						120						125						
Thr Asp Leu Gly Lys Ala Asp Val Asn Gly Gly Lys Ala Glu Thr Lys																			
	130					135						140							
Thr Tyr Glu Val Glu Val Cys Cys Ser Asn Leu Asn Tyr Leu Lys Tyr																			
145					150				155					160					

[illegible]

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 200 acides amin,s
(B) TYPE: acide amin,
(C) NOMBRE DE BRINS:
(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: N. meningitidis
(B) SOUCHE: 1610

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

Lys 1	Arg	Asp	Lys	Ala 5	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly 10	Asn	Gly	Ala	Ser	Gly 15	Gly
Thr	Asp	Ala	Ala 20	Ala	Ser	Asn	Gly	Ala 25	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser 30	Glu	Asn
Ser	Lys	Leu 35	Thr	Thr	Val	Leu	Asp 40	Ala	Val	Glu	Leu	Lys 45	Ser	Gly	Gly
Lys 50	Glu	Val	Lys	Asn	Leu	Asp 55	Asn	Phe	Ser	Asn	Ala 60	Ala	Gln	Leu	Val
Val 65	Asp	Gly	Ile	Met	Ile 70	Pro	Leu	Leu	Pro	Lys 75	Asp	Ser	Glu	Ser	Gly 80
Asn	Thr	Gln	Ala 85	Asp	Lys	Gly	Lys	Asn	Gly 90	Gly	Thr	Lys	Phe	Thr 95	Arg
Lys	Phe	Glu	His 100	Thr	Pro	Glu	Ser	Asp 105	Lys	Lys	Asp	Ala	Gln 110	Ala	Gly
Thr	Gln	Thr 115	Asn	Gly	Ala	Gln	Thr	Ala 120	Ser	Asn	Thr	Ala 125	Gly	Asp	Thr
Asn	Gly 130	Lys	Thr	Lys	Thr	Tyr 135	Glu	Val	Glu	Val	Cys 140	Cys	Ser	Asn	Leu
Asn 145	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Gly 150	Leu	Leu	Thr	Arg	Lys 155	Thr	Ala	Gly	Asn	Thr 160

Gly	Glu	Gly	Gly	Asn	Gly	Ser	Gln	Thr	Ala	Ala	Ala	Gln	Thr	Ala	Gln
				165					170					175	
Gly	Ala	Gln	Ser	Met	Phe	Leu	Gln	Gly	Glu	Arg	Thr	Asp	Glu	Lys	Glu
			180					185					190		
Ile	Pro	Ser	Glu	Gln	Asn	Val	Val								
		195					200								

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 200 acides amin,s

(B) TYPE: acide amin.

(C) NOMBRE DE BRINS:

(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *N. meningitidis*

(B) SOUCHE: 867

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

Thr	Lys	Asp	Lys	Pro	Arg	Asn	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Asp
1				5					10					15	
Ala	Ala	Ala	Ser	Asn	Gly	Ala	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	Glu	Asn	Gly	Lys
			20					25					30		
Leu	Thr	Thr	Val	Leu	Asp	Ala	Val	Glu	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	Lys	Lys
		35					40					45			
Ile	Lys	Asn	Leu	Asp	Asn	Phe	Ser	Asn	Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Val	Ser
	50					55					60				
Gly	Ile	Met	Ile	Pro	Leu	Met	Pro	Glu	Thr	Ser	Glu	Ser	Gly	Asn	Asn
65					70					75					80
Gln	Ala	Asp	Lys	Gly	Lys	Asn	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Arg	Lys	Phe
				85					90					95	
Asp	His	Thr	Pro	Lys	Ser	Asp	Glu	Lys	Asp	Thr	Gln	Ala	Gly	Thr	Pro
			100					105					110		
Thr	Asn	Gly	Ala	Gln	Thr	Ala	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Val	Thr	Gly	Gly
		115					120					125			
Gln	Ala	Gly	Lys	Thr	Tyr	Ala	Val	Glu	Val	Cys	Cys	Ser	Asn	Leu	Asn
		130				135					140				
Tyr	Leu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Leu	Thr	Arg	Lys	Thr	Ala	Asp	Asn	Thr	Val
145					150					155					160
Gly	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Ser	Thr	Ala	Ala	Ala	Gln	Thr	Ala	Gln	Gly

165 170 175

Ala Gln Ser Met Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Lys Glu Ile
 180 185 190

Pro Lys Glu Gln Gln Asp Ile Val
 195 200

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 198 acides amin,s
(B) TYPE: acide amin,
(C) NOMBRE DE BRINS:
(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: N. meningitidis
(B) SOUCHE: S3032

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

Thr	Lys	Asp	Lys	Pro	Ala	Asn	Gly	Asn	Thr	Ala	Glu	Ala	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	
Thr	Asp	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	Glu	Asn
			20					25					30		
Ser	Lys	Leu	Thr	Thr	Val	Leu	Asp	Ala	Val	Glu	Leu	Thr	His	Gly	Gly
		35					40					45			
Thr	Ala	Ile	Lys	Asn	Leu	Asp	Asn	Phe	Ser	Asn	Ala	Ala	Gln	Leu	Val
	50					55					60				
Val	Asp	Gly	Ile	Met	Ile	Pro	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	Ser	Thr	Gly	Lys
65					70					75					80
Asn	Asn	Gln	Pro	Asp	Gln	Gly	Lys	Asn	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Ile	Tyr
				85					90					95	
Lys	Thr	Thr	Tyr	Thr	Pro	Lys	Asn	Asp	Asp	Lys	Asp	Thr	Lys	Ala	Gln
			100					105					110		
Thr	Val	Thr	Gly	Gly	Thr	Gln	Thr	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Gly	Asp	Ala
		115					120					125			
Asn	Gly	Lys	Thr	Lys	Thr	Tyr	Glu	Val	Glu	Val	Cys	Cys	Ser	Asn	Leu
	130					135					140				
Asn	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Gly	Leu	Leu	Thr	Arg	Lys	Thr	Ala	Gly	Asn	Thr
145					150					155					160
Val	Gly	Ser	Gly	Asn	Ser	Ser	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Gln	Thr	Asp	Ala
				165					170					175	

Gln Ser Met Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Asn Lys Ile Pro
 180 185 190

Ser Glu Gln Asn Val Val
 195

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 195 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: N. meningitidis
- (B) SOUCHE: 891

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

Thr Lys Asp Lys Pro Gly Asn Gly Ala Arg Leu Gln Ala Ala Arg Cys
 1 5 10 15

Gly Thr Ser Asn Gly Ala Ala Gly Gln Ser Ser Glu Asn Ser Lys Leu
 20 25 30

Thr Thr Val Leu Asp Ala Val Glu Leu Lys Leu Gly Asp Lys Glu Val
 35 40 45

Gln Lys Leu Asp Asn Phe Ser Asn Ala Ala Gln Leu Val Val Asp Gly
 50 55 60

Ile Met Ile Pro Leu Leu Pro Lys Asp Ser Glu Ser Gly Lys Asn Gln
 65 70 75 80

Ala Asp Lys Gly Lys Asn Gly Glu Thr Glu Phe Thr Arg Lys Phe Glu
 85 90 95

His Thr Pro Glu Ser Asp Glu Lys Asp Ala Gln Ala Gly Thr Pro Ser
 100 105 110

Asn Gly Ala Gln Thr Ala Ser Asn Thr Ala Gly Asp Thr Asn Gly Lys
 115 120 125

Thr Lys Thr Tyr Glu Val Asn Leu Cys Ser Asn Leu Asn Tyr Leu Lys
 130 135 140

Tyr Gly Leu Leu Thr Arg Lys Thr Ala Gly Asn Thr Gly Glu Gly Gly
 145 150 155 160

Asn Ser Ser Pro Thr Ala Ala Gln Thr Ala Gln Gly Ala Gln Ser Met
 165 170 175

Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Lys Glu Ile Pro Asn Asp Gln
 180 185 190

Asn Val Val
195

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 29 paires de bases
(B) TYPE: nucl,otide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

AAACCCGGAT CCGTTGCCAG CGCTGCCGT

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 85 paires de bases
(B) TYPE: nucl,otide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

TTTTTTCATG AGATATCTGG CAACATTGTT GTTATCTCTG GCGGTGTAA TCACCGCCGG

60

GTGCCTGGGT GGCGCGGCA GTTTC

85

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases
(B) TYPE: nucl,otide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

GTGTTTTTGT TGAGTGCATG CCTGGGTGGC

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 40 paires de bases

- (B) TYPE: nucl,otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

TGCGCAAGCT TACAGTTTGT CTTTGGTTTT CGCGCTGCCG

40

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 40 paires de bases
- (B) TYPE: nucl,otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

AAAAAGCATG CATAAAACT ACGCGTTACA CCATTCAAGC

40

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
- (B) TYPE: nucl,otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

TATATAAGCT TACGTTGCAG GCCCTGCCGC GTTTTCCCC

39

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
- (B) TYPE: nucl,otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

CCCGAATTCT GCCGTCTGAA GCCTTATTC

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
 - (B) TYPE: nucl,otide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

CCCGAATTCT GCTATGGTGC TGCCTGTG

28

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 - (B) TYPE: nucl,otide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

CGCATCCAAA ACCGTACCTG TGCTGCCTGA

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 - (B) TYPE: nucl,otide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

TTTATCACTT TCCGGGGGCA GGAGCGGAAT

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 - (B) TYPE: nucl,otide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

GTTGGAACAG CAGACAGCGG TTTGCGCCCC

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 30 paires de bases

(B) TYPE: nucl,otide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

GAACATACTT TGTTCGTTTT TGCGCGTCAA

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 30 paires de bases

(B) TYPE: nucl,otide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

CCACGGATCC TGCCGTCTGA AGCCTTATTC

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 19 paires de bases

(B) TYPE: nucl,otide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

CGCGGATCCT GCTATGGTG

19

Revendications

1. Une protéine sous forme substantiellement purifiée, qui est la sous-unité de moindre poids moléculaire (Tbp2) du récepteur de la transferrine humaine (RTH) d'une souche de *N. meningitidis* ; la souche étant caractérisée en ce qu'elle n'est pas reconnue en dot blot par un antisérum obtenu à l'encontre d'un polypeptide correspondant à la Tbp2 de la souche *N. meningitidis* M982 (Tbp2 M982) déletée des portions hypervariables du deuxième domaine (région charnière) (Tbp2 M982 Δ 362 - 379 ; Δ 418 - 444 ; Δ 465 - 481 ; Δ 500 - 520) ; et la sous-unité Tbp2 étant caractérisée (i) en ce qu'elle est codée par un fragment d'ADN d'environ 2,1 kb.
2. Une sous-unité Tbp2 selon la revendication 1, qui dérive d'une souche de *N. meningitidis* qui n'est pas reconnue en dot blot par un antisérum obtenu à l'encontre d'un fragment de Tbp2 M982 allant de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 350.
3. Une sous-unité Tbp2 selon la revendication 1 ou 2, qui dérive d'une souche de *N. meningitidis* dont la sous-unité Tbp2 est reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum obtenu à l'encontre du RTH de la souche M982 (antisérum anti-RTH M982) et par un antisérum obtenu à l'encontre du RTH de la souche B1616 (antisérum anti-RTH B16B6).
4. Une sous-unité Tbp2 selon l'une des revendications 1 à 3, qui comprend une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 M982, telle que montrée dans l'ID SEQ No. 1, est de 60 à 70%.
5. Une sous-unité Tbp2 selon la revendication 4, qui comprend une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 de la souche M982, telle que montrée dans l'ID SEQ No. 1, est d'environ 65%.
6. Une sous-unité Tbp2 selon la revendication 5, qui comprend une séquence d'acides aminés substantiellement telle que montrée dans l'ID SEQ No. 5.

7. Une sous-unité Tbp2 selon l'une des revendications 1 à 6, en association avec la sous-unité de haut poids moléculaire (Tbp1) de la souche de *N. meningitidis* dont est issue la sous-unité Tbp2.
8. Un polypeptide capable de se lier à la transferrine humaine et dérivé d'une sous-unité Tbp2 selon l'une des revendications 1 à 6, notamment par délétion d'un ou plusieurs acides aminés localisés du côté de l'extrémité C-terminale ou dans la région des quarante premiers acides aminés de la sous-unité Tbp2.
9. Un polypeptide selon la revendication 8, qui dérive de la sous-unité Tbp2 selon l'une des revendications 1 à 6, notamment par délétion partielle du deuxième domaine (ou région charnière) de la sous-unité Tbp2.
10. Un polypeptide selon la revendication 9, qui dérive de la sous-unité Tbp2 selon l'une des revendications 1 à 6, notamment par délétion partielle des régions du deuxième domaine qui sont les homologues des régions de la séquence M982 allant :
 - (i) de l'acide aminé en position 388 à l'acide aminé en position 396 ;
 - (ii) de l'acide aminé en position 418 à l'acide aminé en position 476 ; et
 - (iii) de l'acide aminé en position 499 à l'acide aminé en position 521.
11. Un polypeptide selon la revendication 10, qui dérive de la sous-unité Tbp2 selon la revendication 6, par délétion des régions 377-385, 407-465 et 488-508.
12. Un polypeptide selon la revendication 9, qui dérive de la sous-unité Tbp2 selon l'une des revendications 1 à 6, notamment par délétion substantielle des portions hypervariables du deuxième domaine (ou région charnière) de la sous-unité Tbp2.
13. Un polypeptide selon la revendication 12, qui dérive de la sous-unité Tbp2 selon l'une des revendications 1 à 6, par délétion substantielle des portions hypervariables du deuxième domaine (ou région charnière) de la sous-unité Tbp2 et qui contient le premier et le troisième domaines de la sous-unité Tbp2.
14. Un polypeptide selon la revendication 13, qui dérive de la sous-unité Tbp2 selon la revendication 6, par délétion des portions 351-368, 407-433, 454-470 et 489-508.

15. Un polypeptide selon la revendication 8, qui dérive de la sous-unité Tbp2 selon l'une des revendications 1 à 6, notamment par délétion substantielle du deuxième ou du troisième domaine de la sous-unité Tbp2.
16. Un polypeptide selon la revendication 15, qui dérive de la sous-unité Tbp2 selon l'une des revendications 1 à 6, par délétion substantielle des deuxième et troisième domaines de la sous-unité Tbp2.
17. Un polypeptide selon la revendication 16, qui correspond à l'extrémité N-terminale de la sous-unité Tbp2 selon la revendication 6, allant de l'acide aminé dans l'une des positions 1 à 40, à l'acide aminé dans l'une des positions 334 à 351.
18. Un polypeptide selon la revendication 17, qui correspond à l'extrémité N-terminale de la sous-unité Tbp2 selon la revendication 6, allant de l'acide aminé en position 1, à l'acide aminé dans l'une des positions 334 à 351.
19. Une composition pharmaceutique qui comprend à titre de principe actif, une sous-unité Tbp2 selon l'une des revendications 1 à 7 ou un polypeptide selon l'une des revendications 8 à 18.
20. Une composition selon la revendication 19, qui comprend en outre une sous-unité Tbp2 additionnelle qui dérive d'une souche de *N. meningitidis* dont la sous-unité Tbp2 est reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6.
21. Une composition selon la revendication 20, dans laquelle la sous-unité Tbp2 additionnelle comprend une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 M982, telle que montrée dans l'ID SEQ No. 1, est de 90 à 100 %.
22. Une composition selon la revendication 21, dans laquelle la sous-unité Tbp2 additionnelle est la Tbp2 M982.
23. Une composition selon la revendication 19, qui comprend en outre un polypeptide capable de lier la transferrine humaine et dérivé d'une sous-unité Tbp2 d'une souche de *N. meningitidis* dont la Tbp2 est reconnue en Western blot de fractions

membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6, notamment par délétion d'un ou plusieurs acides aminés localisés du côté de l'extrémité C-terminale de la sous-unité Tbp2.

24. Une composition selon la revendication 23, dans laquelle le polypeptide dérive d'une sous-unité Tbp2 d'une souche de *N. meningitidis* dont la Tbp2 est reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6, notamment par délétion substantielle des régions hypervariables du deuxième domaine (ou région charnière) de la sous-unité Tbp2.
25. Une composition selon la revendication 23, dans laquelle le polypeptide dérive d'une sous-unité Tbp2 d'une souche de *N. meningitidis* dont la Tbp2 est reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6, notamment par délétion substantielle du deuxième ou du troisième domaine de la sous-unité Tbp2.
26. Une composition selon l'une des revendications 23 à 25, dans laquelle le polypeptide dérive d'une sous-unité Tbp2 qui comprend une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 M982, telle que montrée dans l'ID SEQ No. 1, est de 90 à 100 %.
27. Une composition selon la revendication 26, dans laquelle le polypeptide dérive de la Tbp2 M982.
28. Une composition selon la revendication 19, qui comprend en outre une sous-unité Tbp2 additionnelle qui dérive d'une souche de *N. meningitidis* dont la sous-unité Tbp2 n'est pas reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et est reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6.
29. Une composition selon la revendication 28, dans laquelle la sous-unité Tbp2 additionnelle comprend une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 B16B6, telle que montrée dans l'ID SEQ No. 2, est de 95 à 100 %.

30. Une composition selon la revendication 29, dans laquelle la sous-unité Tbp2 additionnelle est la Tbp2 B16B6.
31. Une composition selon la revendication 19, qui comprend en outre un polypeptide capable de lier la transferrine humaine et dérivé d'une sous-unité Tbp2 de *N. meningitidis* dont la sous-unité Tbp2 n'est pas reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et est reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6, notamment par délétion d'un ou plusieurs acides aminés localisés du côté de l'extrémité C-terminale de la sous-unité Tbp2.
32. Une composition selon la revendication 31, dans laquelle le polypeptide dérive d'une sous-unité Tbp2 de *N. meningitidis* dont la sous-unité Tbp2 n'est pas reconnue en Western blot de fractions membranaires par un antisérum anti-RTH M982 et est reconnue par un antisérum anti-RTH B16B6, notamment par délétion substantielle des deuxième et troisième domaines de la sous-unité Tbp2.
33. Une composition selon l'une des revendications 30 à 32, dans laquelle le polypeptide dérive d'une sous-unité Tbp2 qui comprend une séquence d'acides aminés dont le degré d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la Tbp2 B16B6, telle que montrée dans l'ID SEQ No. 2, est de 95 à 100 %.
34. Une composition selon la revendication 33, dans laquelle le polypeptide dérive de la Tbp2 B16B6.
35. Une composition selon les revendications 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ou 27 et 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34.
36. Une composition selon la revendication 35, qui comprend :
 - (i) un polypeptide selon l'une des revendications 9 à 14 ;
 - (ii) un polypeptide tel que décrit dans la revendication 24 ou dans les revendications 24 et 26 ou 27 ; et
 - (iii) une sous-unité Tbp2 telle que décrite dans l'une des revendications 28 à 30.
37. Un fragment d'ADN isolé codant pour une sous-unité Tbp2 selon l'une des revendications 1 à 6 ou pour un polypeptide selon l'une des revendications 8 à 18.

Figure 1 A

```

M 9 8 2  A K T K D K L E N G A A S G S T G A A S G G A A G T S S E N S K L T T V L D A V E L T L N D K K I K N L D N F S N A A Q L V V D G I N I
===== - - - - - =====
8 6 8 0  A N T Q D K P G N G A A A S D G E V R Q H Q T V R Q L D G S E N G K L T T V L D A V E L T H G C T A I K N L D N F S N A A Q L V V D G I N I
350 360 370 380 390 400 410
420 430 440 450 460 470 480
M 9 8 2  P L L P K D S E S G N T Q A D K G K N G C G T E F T R K F E H T P E S D K K D A Q A G T Q T N G A Q T A S N T A G D T N G K T K T Y E V E V C
===== - - - - - =====
8 6 8 0  P L P A E S E S G N N Q A N Q G T N G T A F T R K F D H T P K S D E K D T Q A G T A A N G N P A A S N T A G D T N G K T K T Y E V E V C
420 430 440 450 460 470 480
490 500 510 520 530 540 550
M 9 8 2  C S N L N Y L K Y G H L T R K N S K S A N Q A C G N S S Q A D A K T E Q V E Q S M F L Q C E R T D E K E I P T D Q I V V Y R G S W I C H I A
===== - - - - - =====
8 6 8 0  C S N L N Y L K Y G L L T R K T A G N T V G S G N C S P T A A A Q T D A Q S N F L Q C E R T D E K E I P S E Q I V V Y R G S W I C H I A
490 500 510 520 530 540 550
560 570 580 590 600 610 620
M 9 8 2  N C T S W S G N A S D K E G G N P A E F T V N F A D K K I T G K L T A E N R Q A Q T F T I E G N I Q C H G F E C T A K T A E S C F D L D Q R
===== - - - - - =====
8 6 8 0  N S T S W S G N A S N A T S G N K A D F T V N F G E K K I T C N L T A E N R Q A A T F T I E G T I Q C N G F S C T A K T A D S G F D L D Q S
560 570 580 590 600 610 620
630 640 650 660 670 680
M 9 8 2  N T T R T P K A Y I T D A K V K G G F Y G P K A E E L C G M F A Y P C D K Q T E K A T A T S S D G N S A S S A T W F G A K R Q Q P V Q
===== - - - - - =====
8 6 8 0  N T T C T P K A Y I T N A K V Q C G F Y G P K A E E N C G M F A Y P C D S Q T Q S A S C G A S A S A S A T V W F G A K R Q Q L V Q
630 640 650 660 670 680

```

Figure 1 B

```
M982 CLGGG SFDLSDVTEAPRPAKYQDVSSSEKPAQAKDQGCGGFATLARRAWIP G AEESEVKLNESD
=====
8680 CLGGGGSFOLDVTEAPRPAKYQDVSSSEKPAQAKDQGCGGFATLARRAWIPQANPREDEIRLSND
      20    30    40    50    60    70    80    90
      70    80    90    100   110   120   130
M982 WEATGLTPKPKELPXROKSVIEWETGDSDIYSSPYLTPSKNHQSSAGCNVQPNQATGCHENFQIVIS
== = - - - - - -- - - - - - -- - - - - - == = - - - - -
8680 WEQTD NGDIKN PSKQNNIAL P GNNG GAT LQDSSEN QGIS K VTDYHNFQYVMS
      90    100   110   120   130
      140   150   160   170   180   190   200
M982 GWFYKHA AS EKDFSN KKIКСDDGYIFYHGEXPSRQLPASCKVIYKGVMHFVDTKKKGQDFREIIQP
=====
8680 GFFYKQIKNTIEKNGSSITAARNPGDYIFYKGKOPSRQLPVLGVYTKGTWDELTDVKINQKFIDLGN
      140   150   160   170   180   190   200
      210   220   230   240   250   260   270
M982 SKKQGDRYSGFSGDSEYSNKNESTLKDDHECYGFTSNLEVDENKKLTGKLIRNASLNANTNNDKHT
= = ===== --- -- = - - ---- = = = ===== - - = = =
8680 STKPCDRYSAFSGE LD YIVNKDSKKDGHVAKGLTTEITVDFEKTLNCKLIKNN SVSNNEFNARYT
      210   220   230   240   250   260   270
      280   290   300   310   320   330   340
M982 TQYYSLDAQITGNRENGCATATADKKEN ETKLHPFVSODSSLSGFFGPQGEELGRFLSDDQHVAVVGS
===== - ===== === =====
8680 TQYYSLDATLRGNRNCKATATDKPGTGCTKQHPFVSODSSLSGFFGPKGEELGRFLSDDKHVAVVGS
      280   290   300   310   320   330   340
      350   360   370   380   390   400   410
```

Figure 2 A

346	10	20	30	40	50	60	
		361		380			
1	TKDKLENGAA--ASGSTGAAAAGGAAGTSSSENSKLT	TVLDAVELTLNDKKIKNLDNFSNA	58				
2	TKDKTENGAV--ASGGTDAASNGAAGTSSSENSKLT	TVLDAVELKLGDKVQKLDNFSNA	58				
3	TKDKTENGAV--ASGGTDAASNGAAGTSSSENSKLT	TVLDAVELKLGDKVQKLDNFSNA	58				
4	TQDKPRNGAV--ASGGTGAARSNGAAGQSSSENSKLT	TVLDAVELTLNDKKIKNLDNFSNA	58				
5	TQDKAANGNTAAASGGTDAASNGAAGTSSSENSKLT	TVLDAVELTLNDKKIKNLDNFSNA	60				
6	KRDKAESGGNGASGGTDAASNGAAGTSSSENSKLT	TVLDAVELKSGGKEVKNLDNFSNA	60				
7	TKDKPRNGAV--ASGGTDAASNGAAGTSSSENSKLT	TVLDAVELTLNDKKIKNLDNFSNA	58				
8	TKDKPANGNTAEASGGTDAASNGAAGTSSSENSKLT	TVLDAVELTHGGTAIKNLDNFSNA	60				
9	TKDKPNGA---RLQAARCGTSNGAAGQSSSENSKLT	TVLDAVELKLGDKVQKLDNFSNA	57				
C	*+DK::*G+:+:*****+S+GAAG+SSEN*KLTTVLDAVEL:++*::++LDNFSNA						
	70	80	90	100	110	120	
		417		445			
1	AQLVVDGIMIPLLPKDSESGNTQADKKGK-----	NGGTEFTRKFEHTPESDKKDAQAGTQ	112				
2	AQLVVDGIMIPLLPEASESGNNQANQGT-----	NGGTAFTTRKFDHTPESDKKDAQAGTQ	112				
3	AQLVVDGIMIPLLPEASESGNNQANQGT-----	NGGTAFTTRKFDHTPESDKKDAQAGTQ	112				
4	AQLVVDGIMIPLLPEASESGKNQANQGT-----	NGGTAFTTRKFNHTPKSDEKDTQAGTA	112				
5	AQLVVDGIMIPLLPETSESGSNQADKKGKNGKNGGTD	FYKTTYTPKNDDKDTKAQGTG	120				
6	AQLVVDGIMIPLLPKDSESGNTQADKKGK-----	NGGTFTRKFEHTPESDKKDAQAGTQ	114				
7	AQLVVDGIMIPLLPETSESGNNQADKKGK-----	NGGTAFTTRKFDHTPKSDEKDTQAGTP	112				
8	AQLVVDGIMIPLLPQNSTGKNQPDQKG-----	NGGTAFIYKTTYTPKNDDKDTKAQTV	114				
9	AQLVVDGIMIPLLPKDSESGKNQADKKGK-----	NGETEFTTRKFEHTPESDEKDAQAGTP	111				
C	AQLVV*GIMIPL*P:.S*****+Q*+:G:	NG*T:F*+K+.+TP:+D:KD:+A+T:					

Figure 2 B

	130	140	150	160	170	180	
	465		482		499		
1	TNGAQTASNTAGDTNGKT-----	KTYEVEVCCSNLNYLKYGMLTRKNSKSA	MQAGNSSQ	167			
2	TNGAQTASNTAGDTNGKT-----	KTYEVEVCCSNLNYLKYGMLTRKNSKSA	MQAGESSQ	167			
3	ANGAQTASNTAGDTNGKT-----	KTYEVEVCCSNLNYLKYGMLTRKNSKSA	MQAGESSQ	167			
4	ENGNPAAASNTAGDANGKT-----	KTYEVEVCCSNLNYLKYGMLTRKNSKSA	MQAGESSQ	167			
5	AAGSSGAQTDLGKADVNGGKAETKTYEVEVCCSNLNYLKYGMLTRKNSKSA	MQAGNSSQ	180				
6	TNGAQTASNTAGDTNGKT-----	KTYEVEVCCSNLNYLKYGLLTRKTAGNTGEGG	NGSQ	169			
7	TNGAQTASGTA	GTGGQAG-----	KTYAVEVCCSNLNYLKYGLLTRKTADNTVSG	NGSST	168		
8	TGGTQTASNTAGDANGKT-----	KTYEVEVCCSNLNYLKYGLLTRKTAGNTVSG	NSSPT	169			
9	SNGAQTASNTAGDTNGKT-----	KTYEVNLC-SNLNYLKYGLLTRKTAGNTGEGG	NSSPT	165			
C	:+G+++A**+*G++++.	KTY*V**C*SNLNYLKYG:LTRK:++++:G::S+:					
	190	200	210				
	521						
1	ADAKTEQVEQSMFLQGERTDEKEIPTDQ-NVV	198					
2	ADAKTEQVEQSMFLQGERTDEKEIPSEQ-NIV	198					
3	ADAKTEQVGQSMFLQGERTDEKEIPSEQ-NIV	198					
4	ADAKTEQVGQSMFLQGERTDEKEIPNDQ-NVV	198					
5	ADAKTEQVEQSMFLQGERTDEKEIPNDQ-NVV	211					
6	AAAQTAQGAQSMFLQGERTDEKEIPSEQ-NVV	200					
7	AAAQTAQGAQSMFLQGERTDEKEIPKEQQDIV	200					
8	AAQTD--AQSMFLQGERTDENKIPSEQ-NVV	198					
9	AA-QTAQGAQSMFLQGERTDEKEIPNDQ-NVV	195					
C	A:*:T:*:QSMFLQGERTDE**IP::Q *+V						

Figure 3

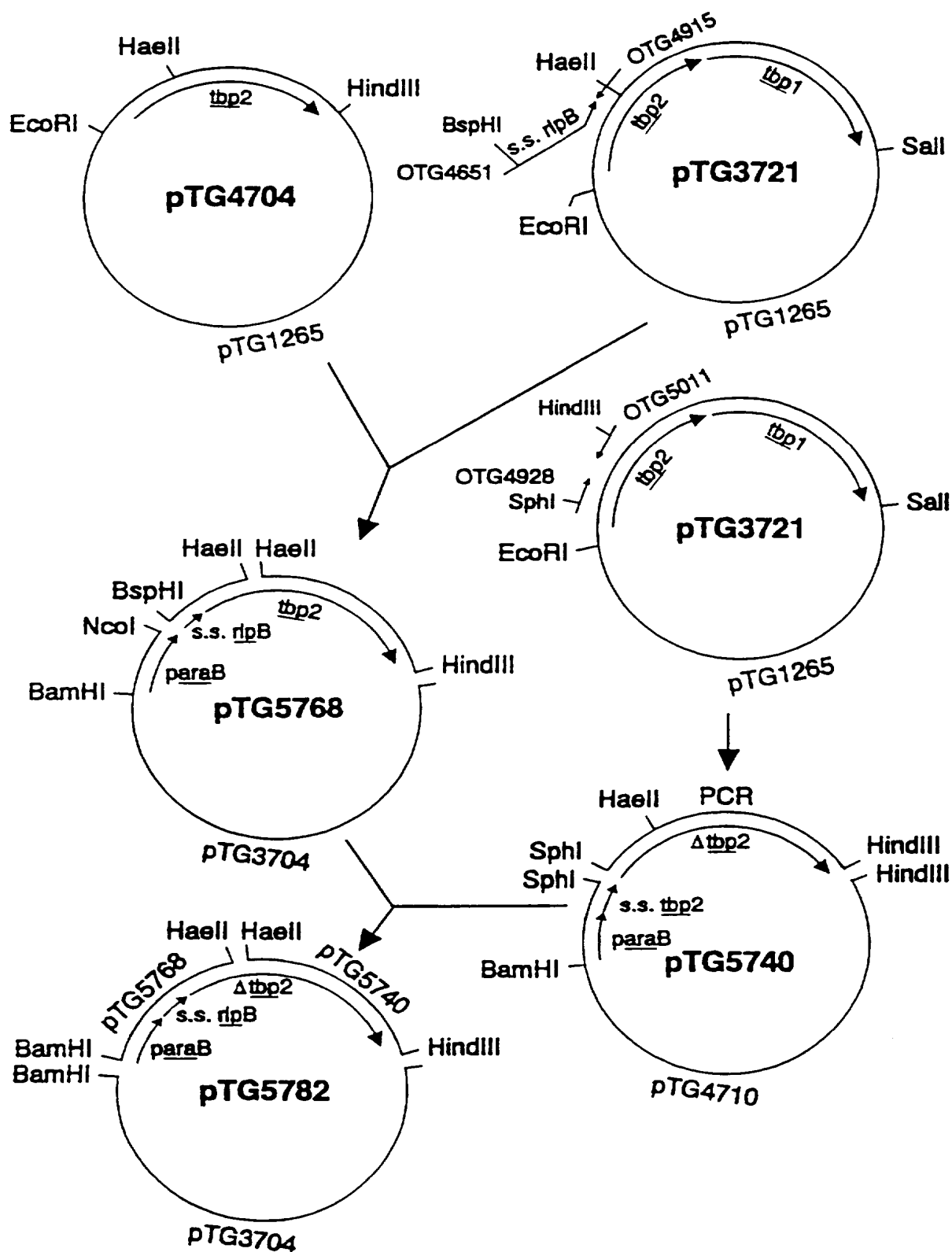


Figure 4

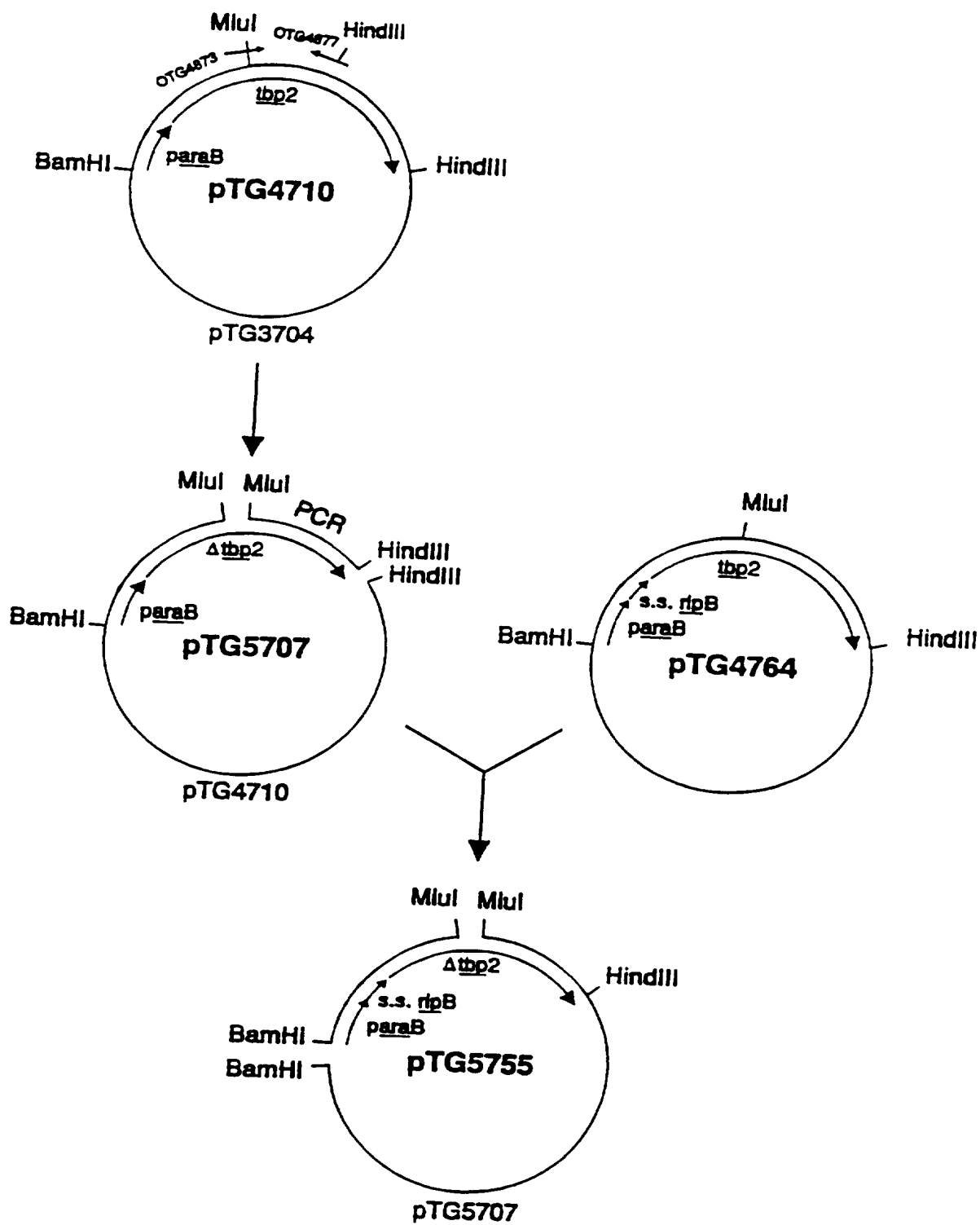
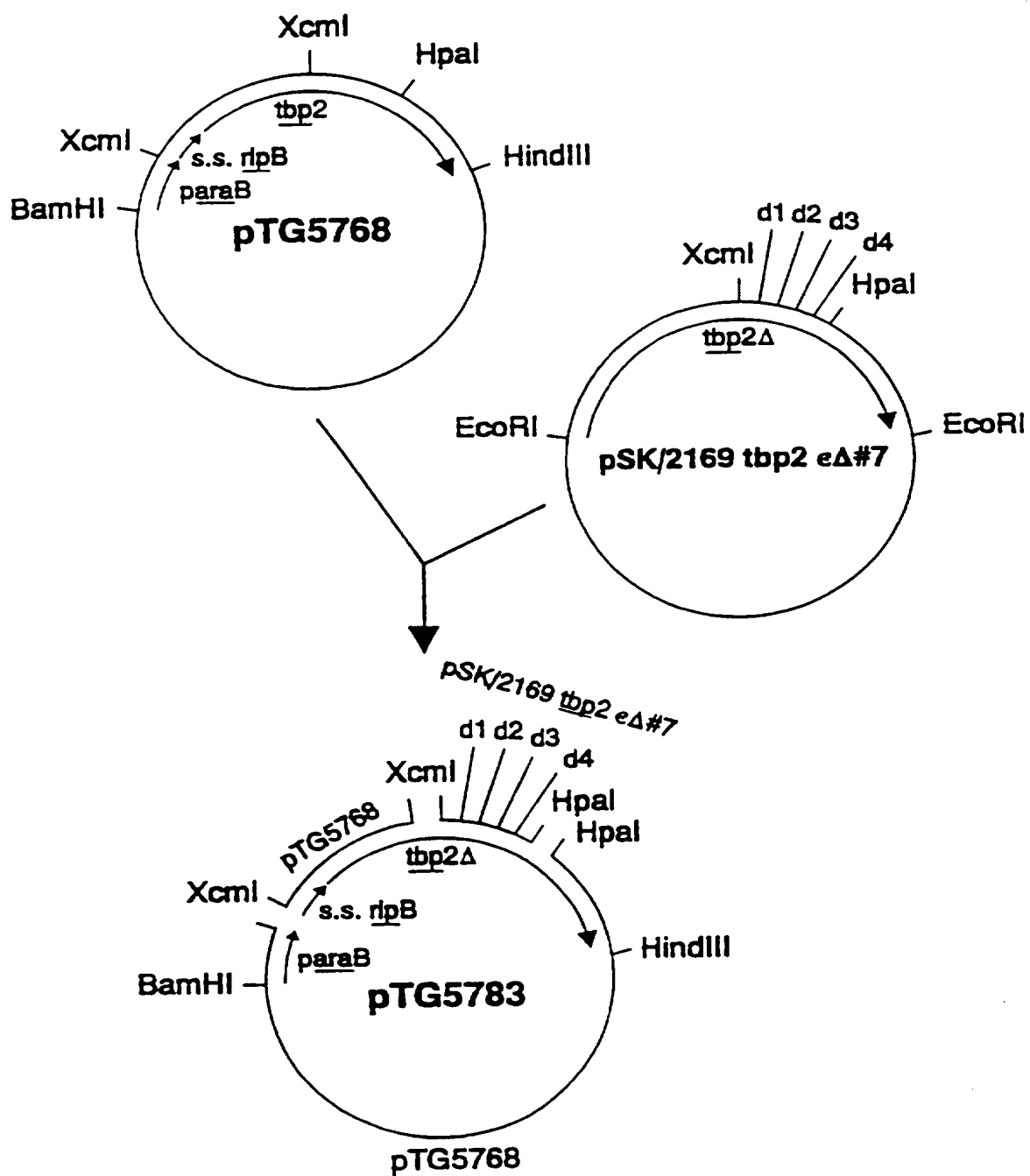


Figure 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 96/01580

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6: C12N15/31 C07K14/22 C07K14/705 C07K16/12 A61K39/095

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 132 (3). 1995. 277-283., XP000578968 ROKBI B ET AL: "Variable sequences in a mosaic-like domain of meningococcal tbp2 encode immunoreactive epitopes" see the whole document ---	1,8
A	GENE (AMSTERDAM), 158 (1). 1995. 145-146., XP002010515 MAZARIN V ET AL: "Diversity of the transferrin-binding protein Tbp2 of Neisseria meningitidis" see the whole document ---	1,8,37
A	FR,A,2 692 592 (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ;TRANSGENE SA) 24 December 1993 cited in the application see claims 1-12; example 2 ---	1,8,19, 37
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 January 1997

Date of mailing of the international search report

31.01.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01580

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 06861 (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC) 15 April 1993 cited in the application see claims 1-14; figure SEQ.ID.3; example 2 ---	1,8,19, 37
A	GENE (1993), 130(1), 73-80 CODEN: GENED6;ISSN: 0378-1119, XP002010516 LEGRAIN, MICHELE ET AL: "Cloning and characterization of Neisseria meningitidis genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 and Tbp2" see the whole document ---	1,8,37
T	WO,A,95 33049 (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ;TRANSGENE SA (FR); MILLET MARIE JOSE) 7 December 1995 see claims 1-14; examples 11,12 -----	1,8,19, 37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01580

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2692592	24-12-93	AU-A- 4009893	23-12-93
		CA-A- 2098448	20-12-93
		EP-A- 0586266	09-03-94
		HU-A- 68443	28-06-95
		JP-A- 6277066	04-10-94
		NO-A- 932222	20-12-93

WO-A-9306861	15-04-93	FR-A- 2682041	09-04-93
		AT-T- 140626	15-08-96
		AU-B- 662176	24-08-95
		AU-A- 2762492	03-05-93
		CA-A- 2097056	04-04-93
		DE-D- 69212459	29-08-96
		DE-T- 69212459	05-12-96
		EP-A- 0560968	22-09-93
		ES-T- 2090696	16-10-96
		FI-A- 932491	01-06-93
		HU-A- 69980	28-09-95
		JP-T- 6503365	14-04-94

WO-A-9533049	07-12-95	FR-A- 2720408	01-12-95
		AU-A- 2675795	21-12-95
		CA-A- 2167936	07-12-95
		EP-A- 0720653	10-07-96
		FI-A- 960428	28-03-96
		NO-A- 960332	21-03-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande Internationale No

PCT/FR 96/01580

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6, C12N15/31 C07K14/22 C07K14/705 C07K16/12 A61K39/095

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 132 (3). 1995. 277-283., XP000578968 ROKBI B ET AL: "Variable sequences in a mosaic-like domain of meningococcal tbp2 encode immunoreactive epitopes" voir le document en entier ---	1,8
A	GENE (AMSTERDAM), 158 (1). 1995. 145-146., XP002010515 MAZARIN V ET AL: "Diversity of the transferrin-binding protein Tbp2 of Neisseria meningitidis" voir le document en entier ---	1,8,37
A	FR,A,2 692 592 (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ;TRANSGENE SA) 24 Décembre 1993 cité dans la demande voir revendications 1-12; exemple 2 --- -/-	1,8,19,37



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 Janvier 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31.01.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 96/01580

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,93 06861 (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC) 15 Avril 1993 cité dans la demande voir revendications 1-14; figure SEQ.ID.3; exemple 2 ---	1,8,19, 37
A	GENE (1993), 130(1), 73-80 CODEN: GENED6;ISSN: 0378-1119, XP002010516 LEGRAIN, MICHELE ET AL: "Cloning and characterization of Neisseria meningitidis genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 and Tbp2" voir le document en entier ---	1,8,37
T	WO,A,95 33049 (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ;TRANSGENE SA (FR); MILLET MARIE JOSE) 7 Décembre 1995 voir revendications 1-14; exemples 11,12 -----	1,8,19, 37

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Recherche internationale No

PCT/FR 96/01580

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2692592	24-12-93	AU-A- 4009893	23-12-93
		CA-A- 2098448	20-12-93
		EP-A- 0586266	09-03-94
		HU-A- 68443	28-06-95
		JP-A- 6277066	04-10-94
		NO-A- 932222	20-12-93

WO-A-9306861	15-04-93	FR-A- 2682041	09-04-93
		AT-T- 140626	15-08-96
		AU-B- 662176	24-08-95
		AU-A- 2762492	03-05-93
		CA-A- 2097056	04-04-93
		DE-D- 69212459	29-08-96
		DE-T- 69212459	05-12-96
		EP-A- 0560968	22-09-93
		ES-T- 2090696	16-10-96
		FI-A- 932491	01-06-93
		HU-A- 69980	28-09-95
		JP-T- 6503365	14-04-94

WO-A-9533049	07-12-95	FR-A- 2720408	01-12-95
		AU-A- 2675795	21-12-95
		CA-A- 2167936	07-12-95
		EP-A- 0720653	10-07-96
		FI-A- 960428	28-03-96
		NO-A- 960332	21-03-96
